

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TÍTULO

Cultivo *in vitro* de *Pachycereus schottii* (Engelmann) D.R. Hunt 1987 y
Stenocereus pruinosus (Otto) Buxbaum 1961, para obtención de metabolitos secundarios

POR

MARIANA PEDRAZA ZAMORA

QUE PRESENTA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN QUÍMICA DE
PRODUCTOS NATURALES

OCTUBRE, 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



TÍTULO

Cultivo *in vitro* de *Pachycereus schottii* (Engelmann) D.R. Hunt 1987 y
Stenocereus pruinosus (Otto) Buxbaum 1961, para obtención de
metabolitos secundarios

Por

MARIANA PEDRAZA ZAMORA

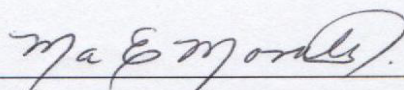
Que presenta como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN QUÍMICA DE
PRODUCTOS NATURALES

San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México

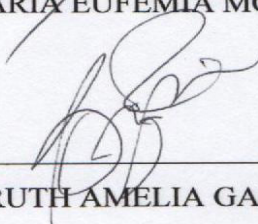
Octubre, 2016

Cultivo *in vitro* de *Pachycereus schottii* (Engelmann) D.R. Hunt 1987 y
Stenocereus pruinosus (Otto) Buxbaum 1961, para obtención
de metabolitos secundarios

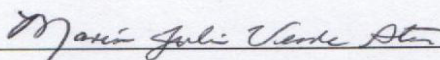
Comité de Tesis



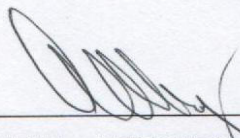
PRESIDENTE: DRA. MARÍA EUFEMIA MORALES RUBIO



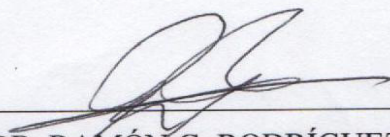
SECRETARIA: DRA. RUTH AMELIA GARZA PADRÓN



VOCAL: DRA. MARÍA JULIA VERDE STAR



VOCAL: DRA. AZUCENA ORANDAY CÁRDENAS



VOCAL: DR. RAMÓN G. RODRÍGUEZ GARZA

San Nicolás de los Garza, Nuevo León

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

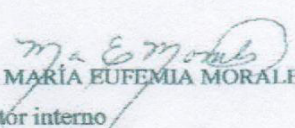


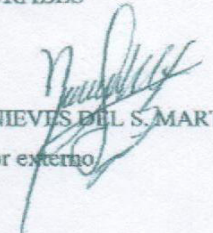
Cultivo *in vitro* de *Pachycereus schottii* (Engelmann) D.R. Hunt 1987 y
Stenocereus pruinosus (Otto) Buxbaum 1961, para obtención
de metabolitos secundarios

Por

BIOL. MARIANA PEDRAZA ZAMORA

Que presenta como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN QUÍMICA DE
PRODUCTOS NATURALES


DRA. MARÍA EUFEMIA MORALES R.
Director interno


DRA. NIEVES DEL S. MARTÍNEZ CRUZ
Director externo

San Nicolás de los Garza, Nuevo León

DEDICATORIA

A Dios por darme la oportunidad de cumplir mis sueños, siempre tomada de su mano.

A mi madre Ma. Guadalupe Zamora Avalos, por apoyarme siempre y motivarme a seguir mis sueños, por enseñarme a siempre ver el lado positivo de las cosas y tomar todas las circunstancias difíciles para sacar lo mejor de mí.

A mi padre, por que indirectamente, con tus acciones, forjaste mi carácter para alcanzar siempre mis metas.

A mi esposo Francisco J. Torres Hilario por apoyarme en todo momento, gracias amor por escucharme, por ser mi compañero y por estar siempre detrás de mí para impulsarme cuando quiero rendirme, ¡lo logramos amor!

A mi hijo Christian, te amo con todo mi ser, y a tus hermanos (as) que algún día llegaran también, son mi motor de vida.

A mis hermanos, Oscar y Alejandro por siempre apoyarme para mi desarrollo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Eufemia Morales Rubio, por apoyarme tanto en la realización de este trabajo de investigación, por motivarme constantemente, por todos sus consejos, enseñanzas, por compartir tantas experiencias conmigo, la quiero mucho, gracias por confiar en mí.

Al Dr. Jaime Francisco Treviño Neáñez (QEPD), estoy infinitamente agradecida de haber tenido la oportunidad de conocerlo y aprender tanto de él, gracias por todo su apoyo, confianza y por formarme mejor, tanto académicamente como personalmente.

A la Dra. Ruth Garza Padrón por todos sus consejos y sus observaciones tan enriquecedoras para este trabajo de investigación, gracias por aportar tanto en mi formación profesional.

Al Dr. Ramón Gerardo Rodríguez Garza, por apoyarme en la realización de este proyecto, por sus comentarios y aportaciones.

Agradezco a la Dra. Julia Verde Star, por la confianza para realizar este proyecto, por todas sus aportaciones y apoyo.

Por supuesto a la Dra. Azucena Oranday Cárdenas, aprecio sus recomendaciones para realizar este proyecto.

A la Dra. Nieves Del Socorro Martínez, por todas sus aportaciones y correcciones, a pesar de la distancia.

Al Dr., José Ezequiel Viveros Valdez, por ayudarme en todas mis dudas, por siempre cuestionarme en la parte experimental para enriquecer este trabajo.

A mis amigos de laboratorio: Dianita Aceves, Claudia Espinosa, Deniss Perales y Rodrigo Esparza, por apoyarme tanto en lo experimental, como por sus recomendaciones para enriquecer este trabajo, por alentarme y escucharme, por soportar mis locuras y bromas, los quiero mucho amigos, sin duda de las mejores cosas que me deja el posgrado.

A mis compañeros de laboratorio: Íngrid, Dianita, Laura, Bere, por ayudarme en la parte experimental.

A mi hermana Nadia Cárdenas, por siempre escucharme y alentarme.

A todas las personas que me ayudaron y apoyaron a lo largo de esta investigación.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco a CONACYT por el apoyarme con la beca No.332120 para la realización de este proyecto.

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL por permitirme realizar este proyecto en sus instalaciones.

Tabla de contenido

Sección	Página
1. RESUMEN	1
1.1 Abstract	2
2. INTRODUCCIÓN	3
3. ANTECEDENTES	4
3.1 Cultivo de tejidos vegetales	4
3.1.1 Cultivo de callo	6
3.1.2 Producción <i>in vitro</i> de metabolitos secundarios	8
3.2 Características de las especies estudiadas	11
3.2.1 Ubicación taxonómica y características de <i>P. schottii</i>	11
3.2.2 Ubicación taxonómica y características de <i>S. pruinosus</i>	12
3.2.3 Usos Etnobotánicos de las especies en estudio	13
3.3 Actividad biológica	13
3.3.1 Actividad bactericida	14
3.3.2 Actividad fungicida	14
3.3.3 Actividad antioxidante	15
3.4 Actividad biológica de <i>Pachycereus schottii</i> y <i>Stenocereus pruinosus</i>	16
3.5 Bioensayo de Letalidad de <i>Artemia salina</i>	18
3.6 Determinación de grupos funcionales	18
3.7 Cromatografía en capa fina	19
4. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA	21
5. HIPÓTESIS	22
6. OBJETIVO GENERAL	23

6.1 Objetivos Particulares	23
7. MATERIAL Y MÉTODOS	24
7.1 Material Biológico	24
7.2 Metodología	24
7.2.1 Medios de cultivo	24
7.3 Inducción de callo	28
7.4 Obtención de extractos	28
7.4.1 Obtención de extractos de planta	28
7.4.2 Obtención de extractos <i>in vitro</i>	29
7.5 Pruebas de tamizaje fitoquímico	29
7.6 Actividad biológica	31
7.6.1 Bioensayo de letalidad de <i>A. salina</i>	31
7.6.2 Actividad Bactericida	32
7.6.2.1 Cepas	32
7.6.2.2 Tinción Gram	32
7.6.2.3 Activación de bacterias	33
7.6.2.3.1 Cinética de bacterias	33
7.6.2.3.2 Método de difusión en placa	33
7.6.3 Actividad fungicida	34
7.6.3.1 Cepas	
7.6.3.2 Activación de las cepas	34
7.6.3.3 Método de difusión en placa	34
7.6.4 Actividad Antioxidante	35
7.6.4.1 Actividad antioxidante por el método del 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH).	35
7.6.4.2 Actividad antioxidante por el método de decolorización del catión radical ABTS.	36
7.6.5 Cuantificación de fenoles totales	36

7.6.5.1 Actividad antioxidante por el método de cuantificación de fenoles totales (Folin-Ciocalteu).	36
7.7 Cromatografía en capa fina	37
7.8 Análisis estadístico	38
8. RESULTADOS	39
8.1 Rendimiento de extractos <i>in vitro</i>	39
8.1.1 Rendimiento de extractos de callo <i>in vitro</i>	39
8.1.2 Rendimiento de extractos de brote <i>in vitro</i>	39
8.1.3 Obtención de extractos de planta <i>in vivo</i>	40
8.2 Respuesta morfogénica	41
8.3 Análisis estadístico para respuesta morfogénica	48
8.4 Pruebas de tamizaje fitoquímico	53
8.4.1 Pruebas fitoquímicas de extractos metanólicos <i>in vitro</i>	53
8.4.2 Pruebas fitoquímicas de extractos hexánicos <i>in vitro</i>	56
8.4.3 Pruebas fitoquímicas del extracto etanólico acidificado (EtOH + HCl 3%) de <i>S. pruinosus in vivo</i>	56
8.5 Actividad biológica	57
8.5.1 Toxicidad sobre <i>A. salina</i>	57
8.5.2 Actividad antibacteriana	57
8.5.2.1 Tinción gram	57
8.5.2.2 Cinética bacteriana	58
8.5.2.3 Actividad antibacteriana	62
8.5.3 Actividad Antioxidante	65
8.5.3.1. Método DPPH	65
8.5.3.2. Actividad antioxidante por el método de decolorización ABTS	66

8.5.3.3 Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu	68
8.6 Cromatografía en capa fina	69
9. DISCUSIÓN	70
10. CONCLUSIONES	78
11. LITERATURA CITADA	80
12. RESUMEN BIOGRÁFICO	92

Listado de Tablas

TABLA	Descripción	Pagina
I	MS (1962), Sales básicas y compuestos orgánicos del medio	26
II	Medios de cultivo probados	27
III	Extractos de mayor rendimiento , probados con los métodos DPPH, ABTS y Folin Ciocalteu	35
IV	Cromatografía en capa fina de los extractos estudiados	37
V	Rendimiento de callo en gramos	39
VI	Rendimiento de brote pigmentado en gramos	40
VII	Rendimiento en % obtenido para los extractos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	40
VIII	Respuesta <i>morfogenética</i> de los explantes ante los diferentes tratamientos	41
IX	Análisis estadístico de la respuesta morfogénica para <i>P. schottii</i> y <i>S. pruinosus</i> Rendimiento obtenido para los extractos de callo	48
X	Pruebas para la determinación de grupos funcionales en extractos metanólicos	54
XI	Pruebas para la determinación de grupos funcionales en extractos hexánicos	56
XII	Pruebas para la determinación de grupos funcionales en extracto etanólico acidificado de <i>S. pruinosus</i>	56
XIII	Resultados del ensayo sobre <i>A. salina</i>	57
XIV	Resultado de la tinción Gram.	58
XV	Actividad antibacteriana de los extractos probados de ambas especies	62
XVI	Actividad antioxidante por el método del DPPH	66
XVII	Actividad antioxidante por el método de ABTS	67

Listado de figuras

Figura	Descripción	Página
1	Planta de <i>Pachocereus schottii</i>	12
2	Planta de <i>Stenocereus pruinosus</i>	13
3	Explantes <i>in vitro</i> de <i>Pachocereus schottii</i>	24
4	Explantes <i>in vitro</i> de <i>Stenocereus pruinosus</i>	24
5	<i>P. schottii</i> en M1	44
6	<i>P. schottii</i> en M3	44
7	<i>P. schottii</i> en M4	44
8	<i>P. schottii</i> en M5	44
9	<i>P. schottii</i> en M12	45
10	<i>P. schottii</i> en M13	45
11	<i>P. schottii</i> en M14	45
12	<i>P. schottii</i> en M15	45
13	<i>P. schottii</i> en M16	45
14	<i>P. schottii</i> en M17	45
15	<i>P. schottii</i> en M18	46
16	<i>P. schottii</i> en M19	46
17	<i>S. pruinosus</i> en M5	46
18	<i>S. pruinosus</i> en M6	46
19	<i>S. pruinosus</i> en M7	47
20	<i>S. pruinosus</i> en M8	47
21	<i>S. pruinosus</i> en M9	47
22	<i>S. pruinosus</i> en M10	47
23	<i>S. pruinosus</i> en M11	47
24	<i>S. pruinosus</i> en M12	47
25	<i>S. pruinosus</i> en M15	47
26	<i>S. pruinosus</i> en M16	47
27	<i>S. Pruinosus</i> en M17	48

28	<i>S. pruinosus</i> en M18	48
29	<i>S. pruinosus</i> en M19	48
30	<i>S. pruinosus</i> en M20	48
31	Influencia de auxinas y citocininas en la formación de brote en <i>P. schottii</i>	49
32	Influencia de auxinas y citocininas en la formación de raíces en <i>P. schottii</i>	50
33	Influencia de auxinas y citocininas en la formación de pelos radiculares en <i>P. schottii</i>	50
34	Influencia de auxinas y citocininas en la formación de pigmento en <i>P. schottii</i>	50
35	Influencia de auxinas y citocininas en la formación de callo en <i>P. schottii</i>	51
36	Influencia de auxinas y citocininas en la formación de areolas en <i>P. schottii</i>	51
37	Influencia de auxinas y citocininas en la formación de brote en <i>S. pruinosus</i>	51
38	Influencia de auxinas y citocininas en la formación de raíz en <i>S. pruinosus</i>	52
39	Influencia de auxinas y citocininas en la formación de pelos radiculares en <i>S. pruinosus</i>	52
40	Influencia de auxinas y citocininas en la formación de pigmento en <i>S. pruinosus</i>	52
41	Influencia de auxinas y citocininas en la formación de callo en <i>S. pruinosus</i>	53
42	Influencia de auxinas y citocininas en la formación de areolas en <i>S. pruinosus</i>	53
43	Cinética de crecimiento de <i>S. aureus</i>	59
44	Cinética de crecimiento de <i>S. typhimurium</i>	59
45	Cinética de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i>	60

46	Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i>	60
47	Cinética de crecimiento de <i>E. faecalis</i>	61
48	Cinética de crecimiento de <i>B. cereus</i>	61
49	Halos de inhibición sobre <i>S. aureus</i>	64
50	Halos de inhibición sobre <i>S. typhimurium</i>	64
51	Halos de inhibición sobre <i>E. coli</i>	65
52	Curva de equivalentes de trolox	67
53	Curva estándar de equivalentes de Ác. Gálico	68
54	Cromatografía en capa fina	69

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
°C	Grados centígrados
μL	Microlitros
1N	1 Normal
2N	2 Normal
Abs	Absorbancia
ABTS	Ácido 2,2-azinobis-(3- etilbenzotioazolín-6-sulfónico)
Ác	Ácido
2,4-D	Ácido 2, 4, diclorofenoxiacético
IAA	Ácido indolacético
ANA	Ácido naftalenacético
BAP	Bencilaminopurina
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
cm	Centímetros
D	Días
DL ₅₀ (LD ₅₀)	Dosis letal media
DPPH	2,2-difenil 1-picrilhidracil
CE ₅₀	Concentración efectiva media
Eq	Equivalentes
EtOH	Etanol
g	Gramo
h	Horas
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorhídrico

AIB	Ácido indol butírico
ICC	Infusión cerebro corazón
K	Kinetina
KMnO ₄	Permanganato de potasio
L	Litro
Lb	Libras
M	Metros
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
Mg	Magnesio
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MS	Murashige y Skoog
MS/ SR	Murashige y Skoog sin reguladores
NA	No aplica
nm	Nanómetros
PDA	Papa dextrosa
PVP	Polivinilpirrolidona
S	Segundos
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente en trolox
UFC	Unidades formadoras de colonia

1. RESUMEN

La obtención de metabolitos secundarios de importancia para el hombre a través de los sistemas de cultivo *in vitro*, tienen en la actualidad una gran importancia, tanto en el aspecto económico como sustentable. El objetivo de este trabajo fué producir metabolitos secundarios de *Pachycereus schottii* y *Stenocereus pruinosus*, con actividad biológica por medio de cultivo *in vitro*. Se prepararon diferentes medios de cultivo, a los cuales se varió la concentración y/o el tipo de regulador de crecimiento, posterior a esto se realizaron los extractos obtenidos de tejido *in vitro* utilizando diferentes solventes, a cada extracto se le realizaron pruebas de tamizaje fitoquímico, actividad biológica (tóxica, bactericida, fungicida), antioxidante (DPPH y ABTS), cuantificación de fenoles totales, además de comparar mediante cromatografía en capa fina los extractos obtenidos *in vitro* y de planta silvestre de las especies seleccionadas. Los resultados obtenidos en cuanto a la respuesta morfogénética fue la formación de callo, brotes, raíces y pigmento, las pruebas de tamizaje fitoquímico fueron positivas en su mayoría para sesquiterpenlactonas, lactonas, esteroides, triterpenos, flavonoides, saponinas, oxidrilos fenólicos, y alcaloides. Con *A. salina* se obtuvo una DL_{50} de 282.2 $\mu\text{g/mL}$ para *Pachycereus schottii*, y para *Stenocereus pruinosus* fue 79.6 $\mu\text{g/mL}$. Los extractos resultaron activos sobre las bacterias de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*. En cuanto a la actividad antioxidante, la prueba de DPPH obtuvo una EC_{50} de 3.7 $\mu\text{g/mL}$ y para *Stenocereus pruinosus*, la EC_{50} fue de 1.59 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados para el bioensayo de ABTS, sobre *Pachycereus schottii* fue de 122.7 $\mu\text{g/mL}$ equivalentes de trolox. Para la cuantificación de fenoles totales sobre *Pachycereus schottii* se obtuvo 58.9 $\mu\text{g/mL}$ equivalentes de ácido gálico. La comparación de la cromatografía en capa fina reveló la presencia de esteroides y aceites esenciales. Se recomienda dar seguimiento al cultivo *in vitro* de ambas especies para optimizar la obtención de metabolitos de interés.

ABSTRACT

The obtaining of secondary metabolites side of importance for the man through them systems of cultivation *in vitro*, have currently a great importance, both in the appearance economic as sustainable. The objective of this work was to produce secondary metabolites with biological activity by a system of *in vitro* culture of *Pachycereus schottii* and *Stenocereus pruinosus*. The *in vitro* culture was establish, performing different culture media, where the concentration and type of growth regulator was varies. Then, the extracts from *in vitro* tissue was obtain using different solvents. The extracts were subjected to various tests: phytochemical screening, biological activity (toxic, bactericide, fungicide), antioxidant (DPPH and ABTS), quantification of total phenols, in addition to comparing by thin layer chromatography extracts obtained *in vitro* and wild plant. The results in terms of response was morphogenetic callus formation, shoots, roots and pigment, phytochemical screening were positive for the most of functional groups like: sesquiterpenlactones, lactones, sterols, triterpenoids, flavonoids, saponins, phenolic oxidrilos, and alkaloids. Assay of *A. salina* was obtain a LD₅₀ of 282.2 mg/mL for *Pachycereus schottii* and for *Stenocereus pruinosus* was 79.6 ug/mL. The extracts were active on the follow bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus*. As for the antioxidant activity, DPPH test obtained an EC₅₀ of 3.7 .mg / mL and for *Stenocereus pruinosus* EC₅₀ was 1.59 mg/mL. The result for assay of ABTS on *Pachycereus schottii* was 122.7 g/mL Trolox equivalent. For quantification of total phenolic on *Pachycereus schottii*, was obtain 58.9 µg/mL of gallic acid equivalents. Comparison of the thin layer chromatography revealed the presence of sterols, and essential oils. It is recommended to follow up on the *in vitro* culture of both species to optimize the production of metabolites of interest.

2. INTRODUCCIÓN

Un gran número de especies vegetales y otros grupos de organismos, son fuente importante de una amplia variedad de metabolitos secundarios, los cuales tienen diversas funciones en los organismos, sin embargo, para el hombre son relevantes ya que pueden tener ciertas propiedades de importancia en el área de la salud y en otros sectores de la industria y pueden emplearse como: fármacos, insecticidas, saborizantes, aromatizantes, colorantes, cosméticos, etc. Los metabolitos secundarios en plantas se encuentran en raíz, tallo, hojas, flores y frutos, el tipo, así como su efectividad para producirlos, varían de acuerdo a distintos factores como: manejo, posición taxonómica, condiciones ambientales y fisiológicas. La obtención de estos compuestos, además de que deteriora el medio ambiente y pone en riesgo a las especies silvestres, no asegura el suministro constante de estas sustancias ya que los rendimientos se ven afectados por los factores antes mencionados. El desarrollo de técnicas biotecnológicas como el cultivo de células vegetales es una alternativa para solucionar esta problemática, y obtener así una producción de manera continua y homogénea de metabolitos secundarios de interés industrial.

Pachycereus schottii y *Stenocereus pruinosus*, son especies pertenecientes a la familia Cactácea, que se desarrollan en los climas áridos de Norte y Noreste de México, esta familia presenta una amplia gama de metabolitos secundarios de importancia para el hombre. Trabajos anteriores han reportado en estas especies actividad citotóxica relevante, antioxidante, antifúngica y antibacteriana, sin embargo, no se tiene información sobre su comportamiento *in vitro*, por lo que es importante conocer si estas características también se presentan en los tejidos regenerados y así tener una opción para su obtención.

3. ANTECEDENTES

3.1 Cultivo de Tejidos Vegetales

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica mediante la cual podemos desarrollar, células vegetales, tejidos y órganos aislados de la planta madre, en medios artificiales (George *et al.* 2008), en condiciones asépticas e incubarlos en condiciones ambientales controladas (Roca y Mroginski, 1991), por medio de esta técnica, se puede demostrar la totipotencialidad de las células y explotarla para múltiples aplicaciones, como la mejora genética del cultivo (producción haploide y triploide, fertilización *in vitro*, rescate de embriones híbridos), propagación clonal (micropropagación), eliminación de virus, conservación del germoplasma, producción de fitoquímicos a nivel industrial, regeneración de plantas a partir de células manipuladas genéticamente por tecnología de ADN recombinante (ingeniería genética) o la fusión de células (Bhojwani y Dantu, 2013).

Los primeros experimentos utilizando el cultivo de tejidos vegetales fueron realizados por Haberlandt en 1902 (Neumann *et al.* 2009a).

Una ventaja del cultivo *in vitro* es que puede utilizar cualquier parte de la planta (tallo, hoja, semilla, fruto, embrión, cotiledones, raíz, etc.). Las partes meristemáticas son las más utilizadas ya que se encuentran en división activa. Existen diversas técnicas dentro del cultivo de tejidos vegetales, de las cuales, las más utilizadas para la obtención de metabolitos secundarios, son el cultivo de tejidos y las células en suspensión, el primero consisten en la obtención de pequeños segmentos de tejido inoculados en medios semisólidos, en los cuales, de acuerdo a los reguladores de crecimiento utilizados, es posible inducir con cierta facilidad la formación de callos, mientras que las células en suspensión, consiste en mantener en agitación continua los callos en un medio líquido (Ochoa-Alejo. 1990). Los cultivos en suspensión tienen la ventaja de ser fácilmente manipulables, además de obtenerse de manera rápida y simple, esta capacidad es

conferida por la uniformidad y número limitado de tipos celulares, obteniendo así metabolitos secundarios. Esta técnica se ha empleado para la producción de nuevos productos químicos expresados únicamente en los cultivos *in vitro* (Santos-Díaz *et al.*, 2005)

El cultivo de células vegetales ha surgido como una alternativa para la obtención de metabolitos de alto valor agregado, producidos en las plantas en bajas concentraciones y para los cuales, no existen procesos de síntesis química conocidos; sin embargo, para la implementación de esta tecnología es necesario el desarrollo de estrategias que permitan incrementar la productividad de los cultivos *in vitro* (Arias Zabala *et al.* 2009).

Los reguladores de crecimiento vegetal son empleados para inducir el proceso de diferenciación celular, existen varios tipos, entre los que destacan las auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno (Feher *et al.*, 2003). Las auxinas y citocininas se emplean sobre todo en los sistemas de cultivo de tejidos vegetales para regular la división celular y la diferenciación en los explantes (Jiménez, 2005), como es el caso en la organogénesis y multiplicación de *Ortegocactus macdougallii*, en donde el efecto de la adición de ácido naftalenacético y benciladenina fue evaluado obteniendo una abundante proliferación y formación de raíces (Arellano-Perusquía *et al.*, 2013) Por otro lado Elías *et al.*, (2014) al utilizar BAP y ANA obtuvieron formación de raíces en un cultivo de *Echinocereus cinerascens*, además de formación de callo.

Para la inducción de callo de *Cereus peruvianus*, Karimi *et al.*, (2010) utilizaron los reguladores de crecimiento 2,4-Diclorofenoxiacético y ácido naftalenacético, demostrando que al ser utilizados por separado, en una concentración de 4 mg/L, se produce mayor cantidad de tejido calloso.

Bhau y Wakhlu (2015) trabajaron con *Coryphantha elephantidens* en donde obtuvieron formación de brotes al adicionar al medio de cultivo BAP.

Ramírez-Malagón *et al.*, (2007) al usar diferentes combinaciones de auxinas y citocininas (AIA y K) obtuvieron formación de brotes en 10 especies de *Mammillaria*.

3.1.1 Cultivo de callo

El callo, es un conjunto de células amorfas desorganizada, el cual comienza a formarse en las regiones de corte de los explantes, y continúa su proliferación con la adición de reguladores de crecimiento vegetal. Las raíces, brotes, embriones, etc., también pueden desdiferenciarse a callo en condiciones adecuadas (Neumann *et al.*, 2009b). Para el inicio del crecimiento del callo, se deben de tomar en cuenta tres factores principales: (1) la selección de explantes, (2) la elección de un medio de cultivo adecuado, y (3) las condiciones ambientales adecuadas para su desarrollo (Robledo-Paz *et al.*, 2006). Estas agregaciones celulares son una de las estrategias para favorecer la acumulación de compuestos químicos (Trejo-Tapia G y Rodríguez Monroy M., 2007).

El mejor factor para controlar la formación de callo es la adición de reguladores de crecimiento vegetal (auxinas, citocininas, giberelinas, etileno etc.), las concentraciones a utilizar pueden variar según la especie y la respuesta morfogenética dependerá del genotipo, edad del explante, el estado nutricional, etc. Las condiciones del medio de cultivo (temperatura, medio sólido o líquido, luz, etc.) también son importantes en la formación de callo (Smith, 2013). Opatrný en el 2014 demostró que un balance adecuado de auxinas y citocininas da como resultado la formación de callo, además según Nick y Opatrný (2014), el éxito de esta tecnología depende de los componentes esenciales y opcionales que contengan el explante y el medio de cultivo. Los nutrientes esenciales consisten en las sales inorgánicas, fuentes de carbono y energía, vitaminas y fitohormonas (Bhojwani y Dantu, 2013). Otros componentes importantes pero opcionales son los compuestos nitrogenados, ácidos orgánicos y sustancias complejas

Una vez que el callo asociado con el tejido original ha crecido por un tiempo determinado, es necesario subcultivarlo a un medio fresco, para permitir la multiplicación de este (Bhojwani y Dantu, 2013) ya que el crecimiento en el mismo medio lleva al agotamiento de los nutrientes en un tiempo determinado, así como a la gradual desecación del agente gelificante y a la acumulación de metabolitos que pueden resultar tóxicos para el callo (Dodds y Roberts, 1995).

Los subcultivos usualmente son llevados a cabo cada tres a cuatro semanas (Bhojwani y Dantu, 2013) pero en realidad este tiempo varía con la tasa de crecimiento del callo. (Dodds y Roberts, 1995), por lo que es muy importante realizar curvas de crecimiento y determinar los periodos de resiembra (Nogueira *et al.*, 2007).

Una alternativa para la producción de metabolitos de alto valor agregado es el cultivo de tejidos (Robles-Martínez *et al.*, 2016). Es comprensible entonces el interés de grandes industrias en la producción de compuestos naturales de importancia comercial, cuya calidad y costos no se afecten por condiciones climáticas, sanitarias o políticas de la región de producción. Es en este contexto, donde los avances de la biotecnología vegetal, especialmente el cultivo de células y tejidos constituyen una alternativa para la producción de metabolitos secundarios de gran interés (Vanisree y Tsay, 2007).

Existen múltiples trabajos donde se describe la inducción de este tejido, como el realizado por Treviño Neavez en el 2000, en donde se logró la inducción de callo en *Stenocereus griseus* mediante el uso de medio MS (1962) adicionado con: de ác. 2,4-D y K. En la especie *Lophophora williamsii* se logró la inducción de este tejido al adicionar al MS, una citocinina, la Kinetina, en una proporción de 4.0 mg/L y ácido Indolacético en 2.0 mg/L (Esparza Izunsa R. 2004), también se reporta la inducción de callo, a partir de explantes cultivados in vitro, donde se realizan cortes transversales delgados, los cuales son colocados en caja petri con MS (1962) adicionado con 5 mg/L de ác. 2,4-D y 0,25 mg/l de Kinetina, los cuales son puestos en obscuridad durante 30 días a 25 °C.

Aíra *et al.*, (2006) propagaron *in vitro* *Notocactus magnificus*, obteniendo formación de callo al adicionar al medio de cultivo ácido 2,4-D., BAP y tiamina HCL. Con la adición de BAP y ANA, Elías *et al.*, (2014), obtuvieron formación de raíces en un cultivo de *Echinocereus cinerascens*, además de formación de callo, para la especie *Cereus peruvianus*, Karimi *et al.*, (2010) utilizaron los reguladores de crecimiento ác. 2,4-diclorofenoxiacético y ácido naftalenacético, demostrando que al ser utilizados por separado, en una concentración de 4 mg/L, se produce mayor cantidad de tejido calloso, sin embargo

3.1.2 Producción *in vitro* de metabolitos secundarios

Las plantas son fuente de una amplia variedad de compuestos químicos, conocidos como metabolitos secundarios. Un aspecto importante para la productividad de los sistemas *in vitro* es la diferenciación y compartimentalización celular como eventos necesarios para la síntesis de metabolitos secundarios en las plantas. La agregación celular en los cultivos *in vitro* es una de las estrategias para favorecer la acumulación de estos compuestos químicos. Este efecto positivo podría ser explicado como consecuencia de la formación de estructuras morfogénicas y/o por una condición de estrés por limitaciones de oxígeno al interior de los agregados. Se ha visto que la combinación de la agregación con otras estrategias tales como la selección de líneas celulares, la elicitación y la adición de precursores constituye una alternativa para desarrollar bioprocesos a partir de células vegetales *in vitro* para la producción de compuestos químicos de alto valor agregado (Trejo-Tapia G y Rodríguez Monroy M., 2007). Su acumulación en las plantas es baja y lenta, ya que está regulada espacial y temporalmente. Es decir, ocurre en células, órganos y tejidos específicos, en fases determinadas del ciclo de vida de la planta, bajo condiciones estacionales o de estrés (Verpoorte *et al.*, 2002).

La optimización del medio y las condiciones de cultivo pueden incrementar la productividad del compuesto de interés. Sin embargo, se ha demostrado en varios trabajos que las condiciones de cultivo y nutrientes necesarias para el desarrollo de la biomasa no coinciden con las necesarias para la producción del compuesto de interés (Wilken *et al.*, 2005). Este aspecto ha promovido el desarrollo de un sistema de cultivo en dos etapas, una primera que estimule el crecimiento de la biomasa y la segunda que favorezca la biosíntesis del metabolito deseado.

Con respecto a la producción comercial de compuestos de interés, la capacidad de cultivar células en medio líquido ha sido una importante contribución a la biotecnología vegetal (Yesil-Celiktas *et al.*, 2010).

Existen diversas estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios, dentro de las más importantes se encuentran la selección y mejoramiento de la línea celular, la cual consiste en usar la parte de la planta en donde se halla observado la acumulación del metabolito, pues se ha demostrado que líneas obtenidas de diferentes partes de la planta, presentan una producción diferente de metabolitos secundarios (Oncina *et al.*, 2000; Fedoreyev *et al.*, 2000). Otra estrategia para incrementar la producción de metabolitos, es utilizar ingenierías genéticas y metabólicas ya sea incrementando el flujo por una ruta biosintética, incrementando el número de células productoras o por inhibición de la degradación de los productos de interés.

Los nutrientes para el medio de cultivo, es también una de las estrategias más importantes para el incremento de los metabolitos, en todos ellos se encuentran macroelementos, microelementos, vitaminas y fitohormonas, por medio de la concentración y composición de estos, es posible inducir cambios en el crecimiento y en la producción, manipulando el medio de cultivo (Raval *et al.*, 2003). A continuación se detallan diversos efectos que tiene la manipulación de algunos componentes del medio de cultivo sobre el crecimiento y la producción de metabolitos secundarios:

- Fuente de carbono. Se ha encontrado que la concentración inicial de sacarosa afecta el crecimiento, el consumo de nutrientes y la producción de metabolitos secundarios (Akalezi *et al.*, 1999); sin embargo, estos efectos son específicos y dependen de la línea celular con la que se esté trabajando.
- Fuente de fosfato. Está directamente relacionado con el crecimiento y el metabolismo energético, pues participa en la biosíntesis de nucleótidos, fosfolípidos y otras biomoléculas (Thorpe *et al.*, 2013). Las concentraciones bajas de fosfato (en las cuales el fosfato está por debajo de 1,04 mM) pueden llegar a estimular el metabolismo secundario ya sea por la disminución de la tasa de crecimiento que favorece el flujo de nutrientes hacia la producción de metabolitos secundarios (Raval *et al.*, 2003, Sato *et al.*, 1996), o por la activación de enzimas relacionadas con la biosíntesis de estos metabolitos (Ramachandra y Ravishankar, 2002).

- Fuente de nitrógeno. Es un componente fundamental para el crecimiento celular pues es utilizado en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (Thorpe *et al.*, 2013)
- Microelementos. Se han encontrado tres mecanismos por los cuales estos compuestos pueden estimular la producción cuando es incrementada su concentración en el medio de cultivo: favoreciendo el aumento en la concentración de biomasa, si el micronutriente limita el crecimiento (Liu y Zhong, 1996); elicitando la síntesis del metabolito de interés mediante el incremento de la presión osmótica en el medio (Kartosentono *et al.*, 2002) y/o incrementando la disponibilidad de cofactores enzimáticos cuando actúa como grupo prostético, observándose en los dos últimos casos, un incremento en el contenido intracelular del metabolito (Huang *et al.*, 1995).
- Fitohormonas. Tienen diversos efectos que pueden llegar a afectar el crecimiento de las plantas, la producción de metabolitos secundarios está estrechamente ligada a la adición de auxinas y citocininas, (Machakova *et al.*, 2008).
- Condiciones físicas. También tienen efecto sobre las condiciones de crecimiento y producción de metabolitos secundarios, entre ellas destacan: cualquier tipo de estrés, temperatura, presión osmótica, pH, iluminación y elicitación.

Para la producción de metabolitos secundarios *in vitro* existen múltiples trabajos, destacando el cultivo de *Opuntia robusta*, en donde al adicionar al medio ác. 2,4-D, BA, biotina, caseína hidrolizada y prolina, se logró la producción de callo, posteriormente al adicionarle ácido jasmónico se incrementó la producción de compuestos fenólicos. Robles-Martínez *et al.*, (2016), lograron establecer el cultivo de callo y de suspensiones celulares en tres especies del género *Opuntia* (*Opuntia streptacantha*, *Opuntia megacantha*, *Opuntia ficus-indica*) adicionando al medio MS diferentes concentraciones de Ác. 2,4-D y BA, demostrando que la concentración de antioxidantes fue tres veces mayor en este tipo de cultivo que en las plantas silvestres,

De Aguilar *et al.*, (2015), lograron la producción de un pigmento (betalaína) en la cactácea *Pereskia aculeata* Miller, este pigmento es de suma importancia ya que es

utilizado en la industria alimenticia y recientemente se ha demostrado su importancia medicinal.

3.2 Características de las especies estudiadas

3.2.1 Ubicación taxonómica y características de *P. schottii*

Orden: Cactales

Familia: Cactaceae

Subfamilia: Cactoidea

Tribu: Pachycereus

Género: *Pachycereus* (*Lophocereus* según Bravo-Hollis y Sánchez Mejorado, 1978).

Especie: *schottii* (Engelmann) Britton and Rose.

Nombre vulgar: “Muso”, “Senita”, “Músaro”, “Viejo”, “Tuna barbona”.

Pachycereus schottii (Figura 1), es una planta arborescente con ramas que salen desde la base. Los tallos son más o menos erectos de 1 a 3m de altura, de color amarillo verdosos y de 5 a 10 cm de diámetro. Espinas centrales de 1 a 3, de color gris y de 1 a 3 cm de longitud, las radiales de 3 a 15, de color gris y de 0.5 a 1.5 cm de longitud. Pseudocefalia terminal, consistente en el desarrollo de espinas abundantes, grises y flexibles. Flores infundibuliformes, que surgen lateralmente en la pseudocephalia, hasta como de 4 cm de largo y 3 cm de ancho, blanquecinas o con tinte rosa, que abren por la noche. Fruto rojo, carnoso, globoso hasta ovalado u oblongo, de 1 a 3 cm de ancho, con pulpa roja. Semillas pardas, casi negras, brillantes, ovaladas, de 2 a 3 mm de largo y 1.5 a 2 mm de ancho, hilo casi basal. Distribución noreste de México, Baja California, Sonora, y Sur de Texas, Nuevo México, Arizona. (Bravo Hollis y Sánchez Mejorada, 1978); (Anderson E, 2001).



Fig. 1 Planta de
P. schottii

3.2.2 Ubicación taxonómica y características de *S. pruinosus*

Orden: Cactales

Familia: Cactaceae

Subfamilia: Cereoideae

Tribu: Pachycereae

Subtribu: Stenocereinae Buxab.

Género: *Stenocereus* Berger

Especie: *pruinosus* (Otto) Buxbaum

Nombre vulgar: “pitayo de octubre”, “pitayo”.

Stenocereus pruinosus (Figura 2), es una planta arborescente, con tronco bien definido, de 5 a 6 m de alto, ramificado. Ramas de 8 a 12 cm de diámetro, de color verde oscuro, hacia la extremidad de las ramas azulado, con una pruinosidad blanquecina. Costilla 5 a 8 prominentes, separadas. Espinas radiales de 5 a 8 cm de 1 a 2 cm de largo, de color gris. Espinas centrales, de 1 a 4 cm, de color gris, de 2 a 3 cm de longitud. Flores infundibuliformes que abren durante el día y la noche, blancas de 9 cm de longitud, con tubo receptacular largo; escamas y segmentos exteriores del perianto de color verdoso. Fruto ovoide, de 5 a 8 cm de largo, de color variable rojo púrpura, anaranjado verdoso, con pulpa carnosa, del mismo color que el pericarpelo; las areolas grandes, lanosas y espinosas, se desprenden con facilidad cuando el fruto madura, es colectado a nivel regional por su sabor. Semillas pequeñas de 2 a 2.5 mm de largo, y 1.8 mm de ancho; amplio hilo basal; negras con gruesas puntuaciones. Se

distribuye en los estados de Tamaulipas, Veracruz, Puebla, Guerrero, Oaxaca y Chiapas. (Bravo y Sánchez, 1978 y Anderson, 2001).



Fig. 2 Planta de
S. pruinosus

3.2.3 Usos Etnobotánicos de las especies en estudio

Dentro de los usos para *P. schottii* podemos destacar el dado por los indios mayos de Ahome, Sinaloa para tratar la tuberculosis, además en Sonora se usa el tallo para curar heridas, llagas, úlceras estomacales, cáncer estomacal y diabetes.

<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7982>

Bravo y Scheinvar, (1995) reportan que en la medicina tradicional esta especie es empleada como un medicamento efectivo para combatir algunos tipos de cáncer, úlceras, diabetes y reumas. Se recomienda tomar los tallos en infusión.

L. schottii florece de abril a agosto, la fructificación ocurre de julio a octubre. Las frutas se comen frescas, en jarabe o conserva. El grupo étnico de los Cochimí de Baja California central valora esta planta más por sus tallos, ya que los utilizan como un veneno para los peces. <http://desertplants.clawz.com/index.htm>.

No se encontraron reportes etnobotánicos de *S. pruinosus*.

3.3 Actividad biológica

Las plantas medicinales constituyen una importante fuente en la búsqueda de nuevos compuestos con actividades farmacológicas a partir de productos naturales (Guerra *et al.*, 2004). Actualmente en el mundo se realizan diversos trabajos destinados a respaldar científicamente el uso empírico de las plantas en medicina natural, incluyendo su

utilización con fines antimicrobianos (Biradar *et al.*, 2008), además los extractos de plantas se han convertido en potenciales alternativas tanto para la industria de medicamentos como para la alimentaria debido a la actividad antioxidante de los compuestos naturales (Falco *et al.*, 2011).

3.3.1 Actividad bactericida

La resistencia a los antibióticos es ahora considerado como un importante problema de salud pública con una tendencia creciente a resistencia en aislados clínicos (Davison *et al.*, 2000), recientemente, con la aceptación de la medicina tradicional como una alternativa del cuidado de la salud y el desarrollo de la resistencia microbiana a los antibióticos disponibles han reafirmado la necesidad de su investigación (Taylor P. W. 2013). Shaza *et al.*, (2014), evaluaron la actividad antibacterial de varios extractos de plantas resistentes a los antibióticos contra *Aeromonas hydrophila*, destacando el extracto de *Thymus vulgaris*. Correa *et al.*, en el 2012, comprobaron la actividad antibacteriana de *Eleutherine plicata*, *Geissospermum vellosii* y *Portulaca pilosa*, concluyendo su uso potencial, como fármacos antibacterianos en el futuro. Rodríguez *et al.*, 2010, demostraron la actividad bactericida contra *Bacillus subtilis*, de varios extractos de *Ariocarpus retusus*. Sánchez *et al.*, 2014, utilizaron 8 cultivares de *Opuntia ficus-indica* comprobando su concertación mínima bactericida contra *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholera* y *Clostridium perfringens*, concluyendo que estos cultivares podrían ser utilizados como preventivos en la contaminación de alimentos

3.3.2 Actividad fungicida

En los últimos años se ha incrementado el número de casos de infecciones causadas por hongos, por lo que el buscar nuevos compuestos es de suma importancia (Mesa *et al.*, 2004), además algunos fármacos antifúngicos utilizados en la actualidad (Girois *et al.*, 2005), son poco efectivos e inducen frecuentemente resistencia (Zhang *et al.*, 2005), numerosas investigaciones han surgido hacia la búsqueda de nuevos compuestos (Fenner *et al.*, 2005) tal es el caso de los productos naturales (Navarro García *et al.*, 2003). Davicino *et al.*, (2007), probaron 10 extractos de plantas contra 4

cepas de hongos de las cuales, *Larrea divaricata*, *Gnaphalium gaudichaudianum*, *Baccharis trimera* y *Schinus terebenthifolius* mostraron actividad. Rodríguez *et al.*, 2010, comprobaron la actividad antifúngica de *Ariocarpus kotschoubeyanus* y *Ariocarpus retusus* obteniendo la CI_{50} sobre los hongos dermatofitos *Microsporum gypseum* y *Microsporum nanum* la cual fue de 263.68 y 738.00 mg/mL respectivamente. La actividad antifúngica sobre el extracto etanólico del fruto de *Opuntia stricta* sobre *Candida albicans* fue comprobada obteniendo MIC de 40 mg/mL (Shafiei *et al.*, 2013). Se evaluó la actividad biológica de compuestos bioactivos aislados de *Mammillaria huitzilopochtli* contra 8 hongos fitopatógenos, resultando una inhibición de 100% contra *Phoma* sp, a una concentración de 400µg/mL, pudiendo ser este extracto una fuente de compuestos antifúngicos contra esta especie que ataca la papa (Robles-Zepeda *et al.*, 2009).

3.3.3 Actividad antioxidante

Las propiedades antioxidantes de las plantas tienen una amplia gama de aplicaciones en salud humana. En los últimos años, la prevención de cáncer y enfermedades cardiovasculares se ha asociado con la ingestión de frutas frescas, verduras o téis ricos en antioxidantes naturales (Johnson, 2001). Los antioxidantes tienen la capacidad para disminuir la carga de radicales en el organismo (Bendich, 1990), ya que nuestro cuerpo es incapaz de neutralizarlos, siendo necesaria la ingesta de estos. Estos compuestos actúan liberando electrones en nuestra sangre que son captados por los radicales libres convirtiéndose así en moléculas estables (Desmarchelier, 1998). Existen diversos estudios mediante los cuales puede comprobarse la presencia de antioxidantes, entre los que destacan: DPPH (2,2-difenil-1-picril hidracil), ABTS ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotioazolín-6-sulfónico) y conteo de fenoles totales por el método de Folin Ciocalteu. Numerosos trabajos destacan la presencia de antioxidantes, Prateek *et al.*, (2008), comprobaron la actividad antioxidante de 10 plantas medicinales, destacando la IC_{50} , por el método del DPPH de *Emblica officinalis*. Se comprobó la actividad antioxidante por medio del método del DPPH de *Terminalia chebula*, *Salvia officinalis* L., *Calamintha incana*, *Thymus vulgaris* L., *Matricaria chamomilla*, y *Nigella*

sativa (El-Agbar *et al.*, 2007). Floegel *et al.*, (2011), realizaron un estudio en el cual evaluaron las 50 frutas, verduras y bebidas más utilizadas en Estados Unidos por ser ricos en antioxidantes, y concluyeron que la capacidad antioxidante es reflejada mejor por el ensayo del ABTS que por el DPPH, por lo que sugieren que este ensayo es más útil para la detección de la capacidad antioxidante. La actividad antioxidante de extractos de guayaba fue evaluada por Thaipong *et al.*, (2006) por los métodos ABTS, DPPH, FRAP, además de la cuantificación de fenoles totales, obteniendo resultados relevantes para los extractos metanólicos. Sánchez *et al.*, (2014), utilizaron 8 cultivares de *Opuntia ficus-indica* comprobando su actividad antioxidante concluyendo que pueden ser utilizados como nutraceuticos, o como fuente de compuestos antioxidantes.

3.4 Actividad biológica de *Pachycereus schottii* y *Stenocereus pruinosus*

Lophocereus schottii tiene importancia ya que se ha descubierto su actividad contra bacterias y líneas celulares cancerosas, Morales *et al.*, (2007), evaluó extractos metanólicos de ésta cactácea contra líneas celulares de cáncer mamario y cérvico uterino, resultando muy relevante la actividad contra las células HeLa de cáncer cérvico uterino, ya que presentaron una DI_{50} 11.44 $\mu\text{g/mL}$, con la línea celular MCF-7 la citotoxicidad no fue relevante; además, comprobó la actividad tóxica de extractos crudos acuosos y metanólicos de *L. schottii* sobre *Artemia salina* obteniendo para el extracto metanólico una DL_{50} de 64.57 $\mu\text{g/mL}$ sobre este crustáceo, lo que indica que contiene compuestos activos.

El extracto metanólico de *Lophocereus schottii* presentó actividad antibacteriana relevante sobre *Salmonella typhi*, *Enterobacter aerogenes* y *Listeria monocitogenes* (Morales, 2006).

Kazuko *et. al.*, (2005) seleccionaron a *L. schottii* para un estudio sobre toxicidad, por tener compuestos bioactivos reportados por Kircher (1969), el trabajo consistió en evaluar la toxicidad de los extractos de *Lepechinia hastata*, *Haplopappus sonorensis*, *Lophocereus schottii* y un animal marino *Lophogorgia rigida* sobre 2 organismos

invertebrados, obteniendo una CL_{50} de 9.1 $\mu\text{g/mL}$ a las 48 horas del extracto etanólico de *P. schottii* sobre *Daphnia magna*, a diferencia del efecto no tóxico sobre *Panagrellus redivivus*.

Morales-Rubio *et al.*, (2010), demostraron la actividad amebicida contra *Entamoeba histolytica* para el cultivo de callo *L. schottii* con una CI_{50} de 19.5 $\mu\text{g/mL}$.

Orozco-Barocio *et al.*, (2013), probó el extracto etanólico de *L. schottii* sobre linfoma en ratones, demostrando que al administrar 10mg/Kg aumentó su tasa de supervivencia, además al administrar 50 mg/Kg y 100mg/Kg se demostró una evolución más lenta del tumor concluyendo que el extracto de *L. schottii* inhibe en un 63% el crecimiento de células de linfoma.

Wani *et al.*, (1980), realizaron estudios con *L. schottii* para inhibir tumores, aislando dos compuestos: pilocereína y lofocina, alcaloides reportados con actividad citotóxica. En 1971 Bruhn J., menciona que el compuesto pilocerína, es uno de los alcaloides más complejos encontrados en las cactáceas.

La actividad antioxidante de extractos metanólicos de *L. schottii* fue determinada por tres métodos diferentes, DPPH, TEAC, FRAP, mostrando en todos los ensayos una actividad antioxidante significativa, lo que nos indica que el extracto crudo de esta especie es una fuente para la obtención de dichos compuestos (Morales *et al.*, 2010)

Treviño *et al.*, (2011) evaluaron la actividad antifúngica de *Stenocereus pruinosus* para hongos dermatofitos, presentando una inhibición en dosis inferiores a 125 mg/mL, además reportaron la presencia de alcaloides, triterpenos, saponinas y flavonoides.

La actividad antioxidante, así como el conteo de fenoles y betalaínas totales fue demostrado por García-Cruz *et al.*, (2016) sobre frutos de *S. pruinosus* y *Stenocereus stellatus*, demostrando que la actividad antioxidante más relevante se da en los frutos rojos de *S. pruinosus*.

3.5 Bioensayo de Letalidad de *Artemia salina*

El Instituto Nacional del Cáncer (INC) de los E.U.A., desarrolló un bioensayo para la detección y aislamiento de productos naturales bioactivos conocido como “letalidad de larvas de *Artemia salina*” el cual consiste en la determinación de la DL_{50} de los extractos de las plantas, aquellos que presentan una $DL_{50} < 1000$ ppm, es probable que contengan uno o varios compuestos activos (Lagarto Parra *et al.*, 2001), posteriormente es necesario fraccionar los extractos para repetir los bioensayos a concentraciones menores. El bioensayo con *Artemia salina*, no es específico para actividad antitumoral, ni otra acción fisiológica particular, pero es posible usarlo, previo a bioensayos citotóxicos, que consumen más tiempo y costo. Los resultados obtenidos mediante este ensayo nos permiten la detección de compuestos bioactivos (antitumoral, antibiótico) y representa una ventaja en un cuanto a simpleza, rapidez y bajo costo (McLaughlin *et al.*, 1988).

3.6 Determinación de grupos funcionales

Según Kuklinski (2000), existen diferentes grupos de metabolitos secundarios, los cuales se dividen en: a) isoprenoides: terpenos, aceites esenciales, saponinas, cardiotónicos; b) derivados fenólicos: fenoles y ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos, flavonoides, antocianinas, taninos, quinonas, antracenósidos; c) alcaloides.

Cannell (1998) menciona que la identificación de grupos funcionales indica la presencia visual de ciertos metabolitos secundarios. Las pruebas químicas más comunes son las utilizadas para identificar grupos funcionales, que dan una indicación visual de su presencia, cuando un reactivo reacciona con un metabolito y se produce un compuesto colorido.

Para la identificación de metabolitos secundarios existen diferentes pruebas

químicas, como la prueba del Br_2/CCl_4 (bromo en tetracloruro de carbono) o del KmnO_4 (permanganato de potasio) para insaturaciones; para grupo carbonilo, la prueba de 2-4-dinitrofenilhidracina; para oxidrilos fenólicos: la reacción con FeCl_3 (cloruro de hierro); para esteroides y terpenos la prueba de Liebermann-Burchard (que diferencia entre saponinas, triterpénicas y esteroideas, cuando las primeras dan una coloración rosada-púrpura, y las segundas azul-verde) y la prueba de Salkowski; para la detección de carbohidratos la prueba de Molish, etc. (Kuklinski, 2000).

Según Domínguez (1973), los extractos alcohólicos son importantes para averiguar la presencia de los principios activos de interés, para esto, se toman fracciones de los extractos para determinar alcaloides con los reactivos de Mayer, Dragendorff y ácido túngstico. Otra fracción es tomada para diluirse en agua (2 veces el volumen de esta), sacudiéndola por 30 segundos, si forma espuma, la cual si permanece por dos minutos, nos indica la presencia de saponinas, también la hemólisis es una prueba útil para indicar la presencia de éstas. Las saponinas y sus sapogeninas insaturadas o con varios hidroxilos dan coloraciones con varios reactivos ácidos, de los empleados con los esteroides, como el de Liebermann-Burchard, Salkowski, cloruro de tionilo y tricloruro de antimonio. Las saponinas cuando son glicosiladas dan positivas las pruebas para carbohidratos como la de Molish. Los taninos se detectan con solución de gelatina. Algunos flavonoides se localizan al añadir a una alícuota Mg y HCl y observando si hay espuma rojiza. La presencia de aceites esenciales se averigua si se tritura una parte de la planta y se huelen los aceites esenciales liberados o si se hierve en agua y aparece la formación de gotas aceitosas en agua.

3.7 Cromatografía en capa fina

Una técnica utilizada para la separación de mezclas y sustancias es la cromatografía, descubierta por el botánico ruso Michael Tswett en 1903, quien descubrió que por adsorción selectiva, los pigmentos de las plantas podían separarse al filtrarlos con éter de petróleo en una columna con carbonato de calcio (Domínguez,

1973). Es una técnica utilizada para el estudio de productos naturales, mediante comparaciones fitoquímicas, comúnmente utilizada para el aislamiento de productos naturales (Waksmundzka-Hajnos *et al.*, 2008) funciona por polaridad de los disolventes, la saturación de la atmósfera en el experimento, la polaridad de las sustancias a separar así como la correcta aplicación de la muestra en la placa de sílice, explicándose de esta manera el principio de la separación. Esta prueba indica la pureza, el número de sustancias y la polaridad de las mismas (Domínguez, 1973).

4. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

Ha sido reportada por varios autores y por nuestro grupo de trabajo la presencia de metabolitos secundarios en extractos de tallos de *Pachycereus schottii* y *Stenocereus pruinosus*, su actividad citotóxica (contra células HeLa) y bactericida para la primera especie, y antifúngica (contra dermatógenos), para la segunda, sin embargo, sobre la actividad de extractos obtenidos de cultivo *in vitro*, no existen reportes, por lo que con éste trabajo nos proponemos implementar el cultivo *in vitro* de ambas especies y confirmar las propiedades reportadas en las plantas silvestres, esto representaría una alternativa sustentable para la obtención de metabolitos con actividad biológica sin el deterioro de las especies en estudio. El cultivo *in vitro* es una alternativa biotecnológica para obtener metabolitos de importancia, sin los problemas que conlleva la obtención de estos productos de manera natural, mediante el manejo de los constituyentes de los medios, se logra que las células eficientizan la producción de un metabolito específico y a largo plazo disminuiría en gran medida los costos de obtención.

5. HIPÓTESIS

El cultivo *in vitro* de *Pachycereus schottii* y *Stenocereus pruinosus* producirá metabolitos secundarios con la actividad biológica referida para los tallos de estas especies.

6. OBJETIVO GENERAL

Producir metabolitos secundarios con actividad biológica por medio de cultivo *in vitro* de *Pachycereus schottii* y *Stenocereus pruinosus*.

6.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer el cultivo *in vitro* y la inducción de callo en *Pachycereus schottii* y *Stenocereus pruinosus*.
- Obtener la respuesta morfogénica, en base a los reguladores y concentraciones adicionadas a los medios.
- Obtener los extractos de los tejidos desarrollados *in vitro* de ambas especies.
- Mantener la proliferación de callo friable, sin oxidación.
- Determinar la presencia de los metabolitos secundarios de los extractos por métodos químicos.
- Evaluar la toxicidad de los extractos mediante el bioensayo de *Artemia salina*.
- Evaluar la actividad bactericida de los extractos de *P. schottii* y *S. pruinosus*.
- Evaluar la actividad antifúngica de los extractos de *P. schottii* y *S. pruinosus*.
- Determinar la actividad antioxidante de los extractos obtenidos.
- Evaluar la cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu
- Comparar mediante cromatografía en capa fina los compuestos presentes en los tejidos *in vivo* e *in vitro* de ambas especies.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Material Biológico

Se emplearon plántulas cultivadas *in vitro* de *Pachycereus schottii* (Fig. 3) y *Stenocereus pruinosus* de 3 años de edad (Fig. 4), para inducir como respuesta morfogenética la inducción de callo.



Fig. 3 Explantes *in vitro* de *Pachycereus schottii*



Fig. 4 Explantes *in vitro* de *Stenocereus pruinosus*

Para la evaluación de actividad biológica, se utilizaron huevecillos de *Artemia salina* (Brine Shrimp Eggs San Francisco Bay Brand INC). Cepas bacterianas del cepario del laboratorio: *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*. Y los hongos dermatopatógenos: *Trichopyton tonsurans*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum cookei*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Rhizopus spp.*, del cepario del laboratorio.

7.2 Métodos

7.2.1 Medios de cultivo

El medio de cultivo que se seleccionó, para esta etapa fue el Murashige y Skoog (1962), el cual se elaboró en base a soluciones stock de sales inorgánicas (macronutrientes y micronutrientes) y componentes orgánicos (Tabla I), como fuente de energía se empleó sacarosa (30g/L) y como agentes solidificantes agar (7g/L) o phytagel

(2 g/L), según el medio de cultivo, además de combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento que se describen en la Tabla II.

Tabla I		
MS(1962) Sales básicas y compuestos orgánicos del medio		
Macroelementos		(mg/L)
NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1650
KNO ₃	Nitrato de potasio	1900
CaCl ₂ . 2H ₂ O	Cloruro de calcio	440
MgSO ₄ . 7H ₂ O	Sulfato de magnesio	370
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio	170
Microelementos		(mg/L)
Na ₂ EDTA	EDTA-disódico	37.3
FeSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato ferroso	27.8
H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6.2
MnSO ₄ .H ₂ O	Sulfato de manganeso	16.9
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	Sulfato de zinc	8.6
KI	Yoduro de potasio	0.83
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	Molibdato de zinc	0.25
CuSO ₄ . 5H ₂ O	Sulfato de cobre	0.025
CoCl ₂ . 6H ₂ O	Cloruro de cobalto	0.025
Compuestos Orgánicos		
	Mio-inositol	100 (mg/L)
	Tiamina	4 (mg/L)
	Acido nicotínico	1(mg/L)
	Piridoxina	1(mg/L)
	Polivinilpirrolidona (PVP)	150(mg/L)
	Ácido ascórbico	50(mg/L)
	Sacarosa	30g/L
	Agar	7g/L
	Phytigel	2 g/L
Reguladores de crecimiento		Ver Tabla II

Tabla II Medios de cultivo probados			
MS (1962)	Regulador de crecimiento (mg/L)	Antioxidante (mg/L)	Agente solidificante (g/L)
M1	IBA 0.5 + BAP 1.0	PVP 150 Ác. Ascórbico 50	Phytigel 2
M2	IBA 0.5 + BAP 1.0 líquido	NA	NA
M3	Ác. 2,4, D 2.0	NA	Phytigel 2
M4	ANA 0.5 + Antioxidantes	PVP 150 Ác. Ascórbico 50	Phytigel 2 y líquido
M5	MS/ SR	NA	Phytigel 2
M6	K 1.0 + Antioxidantes	PVP 150 Ác. Ascórbico 50	Phytigel 2
M7	2,4,D 1.0 + K 0.5 + Antioxidantes	PVP 150 Ác. Ascórbico 50	Phytigel 2
M8	2,4,D 2.0 + K 1.0 + Antioxidantes	PVP 150 Ác. Ascórbico 50	Phytigel 2
M9	2,4,D 0.22 + K 0.22 + Antioxidantes	PVP 150 Ác. Ascórbico 50	Phytigel 2
M10	2,4,D 2.20 + K 2.20 + Antioxidantes	PVP 150 Ác. Ascórbico 50	Phytigel 2
M11	2,4,D 4.0 + K 4.0 + Antioxidantes	PVP 150 Ác. Ascórbico 50	Phytigel 2
*M12	2,4,D 0.11 + BAP 10 + Antioxidantes	PVP 150 Ác. Ascórbico 50	Phytigel 2 y líquido
M13	ANA 1.0 mg/L + Antioxidantes	PVP 150 Ác. Ascórbico 50	Phytigel 2
M14	ANA 2.0 + BAP 0.1	NA	Phytigel 2
*M15	2,4,D 0.22 + BAP 10 + Antioxidantes	PVP 150 Ác. Ascórbico 50	Phytigel 2
M16	2,4,D 1.25 + K 0.0625 + Antioxidantes	PVP 150 Ác. Ascórbico 50	Phytigel 2

M17	K 2.0 + AIA 1.0 + Antioxidantes	PVP 150 Ác. Ascórbico 50	Phytigel 2
M18	ANA 0.1 + BAP 2.0	NA	Agar 7 y líquido
M19	AIA 0.9 + BAP 0.9 + Hemisulfato de Adenina 2.0	NA	Phytigel 4
M20	ANA 4 + Antioxidantes	PVP 150 Ác. Ascórbico 50	Agar 7
*M21	ANA 0.1 + BAP 2.0	NA	Medio líquido

*M12: cambia la adición de vitaminas, solo tiene tiamina 0.04 mg/L

*M15: cambia la adición de vitaminas, solo tiene tiamina 0.04 mg/L

*M21: cambia la concentración de macro y micronutrientes, estos fueron agregados a la mitad de la concentración normal.

7.3 Inducción de callo

Los medios antes descritos se probaron para la inducción de la respuesta morfogénica deseada en cada especie, se sembró en Campana de Flujo Laminar 1 explante de brote cultivado *in vitro* por tratamiento en frascos tipo conserva de 250 mL, 10 frascos por tratamiento, los contenedores se etiquetaron e incubaron en el área de cultivo donde se mantuvieron bajo condiciones de luz (12 h) y temperatura (22°C+/-2) constantes. Se monitorearon los cultivos cada semana.

7.4 Obtención de extractos

7.4.1 Obtención de extractos de planta

Se pesó de *P. schottii* 78.2g de tallo y 200g de tallo de *S. pruinosus*, posteriormente se molieron en mortero, agregando 175 y 400 mL de metanol respectivamente, se dejaron en obscuridad durante 1 semana, al cabo de este tiempo se filtraron y evaporaron, y se guardaron en refrigeración, hasta su uso posterior.

Se realizó un extracto de tallo de *S. pruinus* acidificado, la planta se secó en estufa, obteniéndose un peso seco de 204.9 g, posteriormente se molió en un mortero, agregando 300 mL de etanol acidificado con ácido clorhídrico al 3%, se dejó en obscuridad durante 1 semana, al cabo de este tiempo se filtró y evaporó, y se almacenó en refrigeración.

A cada uno de los extractos se les realizó las pruebas preliminares de identificación de metabolitos y actividad biológica, en base a rendimiento.

7.4.2 Obtención de extractos *in vitro*

Los tejidos regenerados, brotes y callos se retiraron del medio y por separado, se molieron en un mortero y se colocaron en un matraz con 100 mL de etanol, se dejó en obscuridad durante 1 semana, al cabo de este tiempo se filtró y evaporó y se almacenó en refrigeración

7.5 Pruebas de tamizaje fitoquímico

*** Materia orgánica**

Prueba de la flama. Se utiliza para diferenciar un compuesto orgánico de un inorgánico. Se colocó una pequeña cantidad de muestra en una asa de platino y se lleva a la flama, si quedan cenizas se concluye que el compuesto es inorgánico.

*** Insaturaciones**

Prueba del KMnO_4 . Se disolvió 1-2 mg. de la muestra en 1 mL de agua, acetona o metanol y se añadió gota a gota una solución de KMnO_4 al 2% en agua. La prueba es positiva si se observa decoloración o formación de precipitado café, resultado de la formación de dióxido de manganeso.

*** Grupo carbonilo**

Prueba de la 2-4 Dinitrofenilhidracina. De 1 a 10 mg. de la muestra se disolvió en etanol, se le añadió una solución saturada de 2-4- Dinitrofenilhidracina en HCl 6N, la formación de un precipitado amarillo o naranja indica la presencia del grupo carbonilo.

* Oxhidrilos fenólicos (taninos vegetales)

Prueba del FeCl_3 . Se disolvió 1-2 mg. de la muestra en 1 mL de agua o etanol y después se añadió unas gotas de cloruro de fierro al 12.5% en agua. La aparición de un precipitado rojo, azul-violeta o verde es considerado positivo.

* Esteroides y triterpenos

Prueba de Liebermann-Buchard. Se mezcló 1 mL de anhídrido acético y uno de cloroformo, se enfrió a 0° y se les añadió una gota de ácido sulfúrico. Se añadió gota a gota este reactivo a la muestra o su solución clorofórmica. Si hay formación de colores azul, verde, rojo, anaranjado, etc., los que cambian con el tiempo, la prueba será positiva. El orden y tiempo de aparición (0, 1, 5, 20, 60 minutos) tiene cierto valor diagnóstico; así una coloración amarilla después de 15 minutos, parece corresponder a C-14-metilo y una variación -7 insaturación. La prueba es positiva con esteroides que contienen 2 enlaces dobles conjugados, que los pueden formar por una o dos deshidrataciones con isomerización.

Prueba de Salkowski. Similar a la de Liebermann-Burchard, la muestra (1-2 mg) en contacto con 1 mL de ácido sulfúrico, da coloraciones amarillo o rojo para esteroides y metilesteroides.

* Carbohidratos

Prueba de Molish. A 1-2 mg. de la muestra se le agregó gota a gota el reactivo de Molish (alfa-naftol al 1% en etanol), luego 1 mL de ácido sulfúrico por las paredes. La prueba es positiva cuando se forma un anillo coloreado en la interfase de color púrpura.

Prueba de las cumarinas. Se disuelve 1-2 mg de muestra en NaOH al 10%, si aparece una coloración amarilla que desaparece al acidular es positiva.

* Sesquiterpenlactonas

Prueba de Baljet. A 2-3 mg. del compuesto se le agregó 3-4 gotas de la solución mezcla, siendo positiva si se torna de color naranja a roja oscura. La solución mezcla 1:1 consiste de una solución A que contiene: ácido pícrico al 1% en etanol y una B: NaOH al 10%.

* Flavonoides

Prueba del H_2SO_4 . Una pequeña cantidad de muestra se disolvió en H_2SO_4 da una

coloración amarilla para flavonoles, naranja-guinda para flavonas, rojo-azuloso para Chalcona y rojo-púrpura para quinonas.

Prueba de Shinoda. La muestra disuelta en etanol, se pone en contacto con limaduras de Mg, se aplicó temperatura (flama) y después se le agregó unas gotas de HCl. Se considera la prueba positiva si se presentan colores naranja, rojo, rosa, azul y violeta.

Leucoantocianinas. Se disuelve una porción del residuo con HCl 2N en propanol-1, durante 15 a 30 minutos. La aparición lenta de una coloración roja o violeta se considerará positiva.

* Alcaloides

Prueba de Dragendorff. Modificación de Munier y Machelobuf. Se prepararon 2 soluciones. Para la solución A se disolvió en 0.85 g de nitrato de bismuto, en una mezcla de 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua. Para la solución B se disolvió 8 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua. El reactivo se prepara mezclando 5 mL de la solución A, 4 mL de la solución B y 100 mL de agua y es estable por un año, la prueba es positiva para alcaloides al dar la placa coloración rojo o naranja, persistentes por 24 horas.

* Saponinas

Prueba de la agitación. Una porción del residuo se disolvió con agua en un tubo de ensayo de 75 X 12mm y luego se agitó vigorosamente durante 3-5 minutos. La formación de espuma con apariencia de panal de abeja, estable por 30 minutos, se considerará prueba positiva. (Molina-Salinas, 2001).

7.6 Actividad biológica

7.6.1 Bioensayo de letalidad de *A. salina*

Se preparó agua de mar artificial para incubar los huevecillos del crustáceo. Para cada extracto de las plantas se prepararon diluciones de 1000, 500, 240, 120, 80, 60 mg/L, cada concentración se realizó por triplicado. Después de 48 h cuando las larvas crecen aproximadamente 3mm, se toman entre 15-20 con una micropipeta y se depositan en los pozos de la microplaca, y se añaden las diluciones de los extractos, como control positivo se empleó Dicromato de Potasio y como negativo agua de mar. Al cabo de

otras 24 h de incubación se contaron los nauplios y se registra el número de muertes. Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis Probit para determinar la DL_{50} . (McLaughlin *et al*, 1988).

7.6.2 Actividad Bactericida

7.6.2.1 Cepas

Las cepas bacterianas fueron obtenidas de aislados clínicos de pacientes, se utilizaron los siguientes microorganismos: *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*.

7.6.2.2 Tinción Gram

En un portaobjetos limpio (con alcohol, papel de filtro y flameado) se coloca una gota de agua destilada a la que, con el asa de siembra, previamente esterilizada a la llama, se lleva una pequeña cantidad de suspensión de bacterias o, en su caso, de una colonia.

Con el asa se extiende la gota y las bacterias sobre el porta y se fija la extensión por el calor, calentando suavemente a la llama del mechero hasta que se seque (Benson, 2001).

Para la coloración se sigue la técnica siguiente:

- a) Inmersión en Cristal Violeta (20 s) (colorante inicial)
- b) Lavado con agua destilada (2 s)
- c) Inmersión en lugol (30 s) (mordiente)
- d) Inmersión en etanol de 95° (10-20 s) (decolorante)
- e) Lavado con agua destilada (2 s)
- f) Inmersión en Safranina (20 s) (colorante de contraste)
- g) Lavado con agua destilada (2 s)
- h) Secado suavemente y sin frotar con papel de filtro

Se observó al microscopio compuesto, con objetivo de inmersión, las Gram + se ven de un color púrpura a violeta y las Gram - de color rojo a rosado.

7.6.2.3 Activación de bacterias

Para la activación de las bacterias se utilizó medio líquido preparado con 5.5 g de ICC (Brain heart infusión) en 150 mL de agua bidestilada. Para el ensayo se utilizaron tubo de ensaye 18 × 150 mm a lo que se les agregaron 5 mL de medio, se esterilizaron a 15 Lb/10 min, se inocularon con las diferentes cepas adicionando una asada a cada tubo previamente identificado y se incubaron durante 12-18 h a 37°C (Silva, 1999).

7.6.2.3.1 Cinética de bacterias

Para realizar la cinética bacteriana se preparó el inóculo, al cual fue adicionado 100µL de la bacteria en ICC líquido, realizándose esto por triplicado. Se midió la absorbancia del blanco y la del inóculo, siendo este el tiempo cero, para posteriormente ser cuantificado cada hora. Se utilizó un espectrofotómetro marca Spectronic Instruments modelo Spectronic Benesys 5, en una longitud de onda de 635nm.

7.6.2.3.2 Método de difusión en placa

Las pruebas biológicas se realizaron mediante el método de difusión en placa colocando 20 µL de cada extracto en cada disco de papel filtro (Whatman No. 1), los cuales se prepararon a una concentración de 100 mg/mL, en el solvente utilizado (hexano, metanol, metanol acuoso al 50 %). Los discos impregnados fueron colocados en una placa con medio ICC previamente inoculadas con la cepa por medio de un hisopo de una suspensión bacteriana de 1×10^6 UFC. Como control negativo se utilizó cada uno de los solventes empleados, impregnando los discos en la misma proporción que el extracto, es decir 20 µL y como control positivo se utilizó gentamicina a una concentración de 10 mg/mL. Las placas se dejaron incubar durante 18-24 h; después de este periodo se midieron los halos de inhibición en milímetros (Ríos *et al.* 1988; Sin *et al.*, 2008; Murphy, 1999).

7.6.3 Actividad antifúngica

7.6.3.1 Cepas

Las cepas fúngicas fueron obtenidas de aislados clínicos de pacientes y de muestras de suelo, se utilizaron los siguientes microorganismos: *Trichopyton tonsurans*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum cookei*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flauus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Rhizopus spp.*

7.6.3.2 Activación de las cepas

A partir de los aislados clínicos que se encontraban en caldo PDA, en condiciones de esterilidad, se tomó una alícuota con la ayuda de un hisopo y se realizó el estriado en las placas con PDA, las cuales se guardaron a temperatura ambiente (24°-31°C) durante 7 días, posterior a este tiempo se realizaron cortes de aproximadamente 1 cm, con la ayuda de un bisturí, en condiciones de esterilidad colocando el inóculo en placas con PDA con el corte invertido al nuevo medio de cultivo, estas siembras fueron realizadas por triplicado para asegurar que no existiera contaminación durante el crecimiento del hongo, posterior a estas siembras se realizó un corte del inóculo de aproximadamente 1cm que fue colocado en un tubo que contenía PDA, el cual se agitó para disgregar la alícuota y posterior a esto se procedió a estriar las placas.

7.6.3.3 Método de difusión en placa

Las pruebas biológicas se realizaron mediante el método de difusión en placa colocando 20 µL de cada extracto en cada disco de papel filtro (Whatman No. 1), los cuales se prepararon a diferentes concentraciones, en base al rendimiento del extracto (Tabla V), en el solvente utilizado (Acuoso, metanol y etanol). Los discos impregnados fueron colocados en una placa con medio PDA previamente inoculadas con la cepa por medio de un hisopo de una suspensión fúngica. Como control negativo se utilizó cada uno de los solventes empleados, impregnando los discos en la misma proporción que el extracto, es decir 20 µL y como control positivo se utilizó fuconazol a una concentración de 2 mg/mL. Las placas se dejaron incubar durante 48-120 h; después de este periodo se midieron los halos de inhibición en milímetros.

7.6.4 Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante fue realizada por los métodos DPPH y ABTS, a aquellos extractos de mayor rendimiento, y que se describen en la Tabla III.

Tabla III. Extractos de mayor rendimiento , probados con los métodos DPPH, ABTS y FOLIN CIOCALTEU			
Numero de extracto	Solvente	Especie	Origen
Extracto 7	MeOH	<i>Stenocereus pruinosus</i>	M18
Extracto 11	MeOH	<i>Pachycereus schottii</i>	M18
Extracto 13	MeOH	<i>Stenocereus pruinosus</i>	Planta <i>in vivo</i>
Extracto 14	MeOH	<i>Pachycereus schottii</i>	Planta <i>in vivo</i>
Extracto 17	MeOH	<i>Stenocereus pruinosus</i>	M12
Extracto 18	Acuoso	<i>Pachycereus schottii</i> Extremo apical	Planta <i>in vivo</i>
Extracto 19	Acuoso	<i>Pachycereus schottii</i> Extremo basal	Planta <i>in vivo</i>
Extracto 26	MeOH	<i>Pachycereus schottii</i>	M19
Extracto 27	EtOH + HCL 3%	<i>Stenocereus pruinosus</i>	M12
Extracto 31	EtOH + HCL 3%	<i>Stenocereus pruinosus</i>	M18

7.6.4.1 Actividad antioxidante por el método del 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH).

Se utilizó el método de Cottele *et al.*, (1996), comúnmente conocido como el método del 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH), obtenido por la empresa Sigma-Aldrich el cual reduce el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil en la 2,2-difenil-1-picril hidracina por la acción antioxidante de compuestos que contienen grupos –OH que decoloran el reactivo DPPH. Se realizaron diluciones seriadas del extracto disuelto previamente en MeOH 80% (1mg/mL), los cuales fueron colocados en una microplaca de 96 pozos. Como control positivo se utilizó la vitamina C (1 mg/mL) y como control negativo DPPH con MeOH 80%. El DPPH fue preparado en una proporción de 0.12 mg/mL. Se añadió a cada uno de los pozos después de ser colocado el extracto y se dejó incubar en obscuridad durante 30 minutos.

Se utilizó un lector de microplaca marca BioTek modelo Epoch, obteniéndose la lectura a 517 nm. Se obtuvo la concertación efectiva media (EC_{50}).

7.6.4.2 Actividad antioxidante por el método de decolorización del catión radical ABTS.

El ensayo del ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotioazolín-6-sulfónico) (ABTS) se basa en la captación de los antioxidantes por el radical catión ABTS•. El radical catión del ABTS posee una coloración verde con un máximo de absorción a 415 nm y una serie de máximos secundarios de absorción a 645, 660, 734, 815 y 820 nm (Re *et al.*, 1999). La generación del radical ABTS• por reacciones químicas, se hace mezclando persulfato potásico con 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (ABAP), el cual debe ser puesto en obscuridad durante 12-16 h a temperatura ambiente. Posteriormente el radical ABTS• fue diluido en etanol al 80% hasta obtener un valor de absorbancia de $0,700 \pm 0,100$ a 754 nm (longitud de máxima absorción). Como control positivo se utilizó el reactivo de trolox elaborado en proporción volumen/volumen. Se utilizaron microplacas de 96 pozos, a las cuales se le adicionaron 180 μ L de la dilución del radical ABTS•, se mezcló con 20 μ L de la muestra y se determinó la absorbancia a 754 nm a 25°C. El resultado se expresa como la Capacidad Antioxidante Equivalente en Trolox (CAET o TEAC por sus siglas en inglés).

Se utilizó un lector de microplaca marca BioTek modelo Epoch.

7.6.5 Cuantificación de fenoles totales

7.6.5.1 Actividad antioxidante por el método de cuantificación de fenoles totales (Folin-Ciocalteu).

La cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu es una reacción colorimétrica de óxido-reducción, en la cual el extracto a evaluar es disuelto en etanol al 80%, se utilizaron 100 μ l del reactivo de Folin-Ciocalteu 1N, colocándolo en pozo). Como control positivo se utilizó el ácido gálico realizando una curva de calibración. El reactivo de Folin-Ciocalteu es amarillo y al estar en contacto con los

extractos cambia a azul. Los resultados son expresados como la capacidad antioxidante de ácido gálico.

7.7 Cromatografía en capa fina

Se utilizaron placas de Sílica gel 60 F₂₅₄ Fisher que fueron colocadas dentro de una cuba cromatográfica. Se colocaron aproximadamente 50 µL de cada extracto mediante un capilar, el extracto se aplicó aproximadamente a 1cm de la parte inferior. Se aplicaron varios extractos para hacer comparaciones entre estos, asegurando que al poner cada gota se dejara secar entre cada una, antes de poner la siguiente. Después de secar las gotas, las placas se colocaron en las cubas cromatográficas con diferentes mezclas de eluentes para su corrimiento y de esta manera encontrar el que separe mejor las fracciones de cada uno de los extractos obtenidos. (Domínguez, 1973).

Los sistemas de eluentes utilizados fueron: Benceno- Acetona, en proporción 9:1, Cloroformo- Metanol, en proporción 9:1, cloroformo-metanol en proporción 7:3.

Los extractos analizados por cromatografía en capa fina, se detallan en la Tabla IV. El R_f fue calculado midiendo la distancia del punto de aplicación de la muestra a la mitad de la mancha detectada y se dividió el valor obtenido sobre la distancia del punto de aplicación de la muestra y la distancia recorrida por el eluente.

Tabla IV. Extractos estudiados por cromatografía en capa fina			
Número de extracto	Solvente	Especie	Origen
Extracto 1	MeOH	<i>Stenocereus pruinosus</i>	M8
Extracto 4	Hexano	<i>Stenocereus pruinosus</i>	M8
Extracto 6	Hexano	<i>Pachycereus schottii</i>	M4
Extracto 11	MeOH	<i>Pachycereus schottii</i>	M18
Extracto 12	MeOH	<i>Stenocereus pruinosus</i>	Fruto
Extracto 13	MeOH	<i>Stenocereus pruinosus</i>	Planta <i>in vivo</i>
Extracto 14	MeOH	<i>Pachycereus schottii</i>	Planta <i>in vivo</i>
Extracto 15	MeOH	<i>Stenocereus pruinosus</i>	M6
Extracto 16	MeOH	<i>Stenocereus pruinosus</i>	M7

Extracto 17	MeOH	<i>Stenocereus pruinosus</i>	M12
Extracto 18	Acuoso	<i>Pachycereus schottii</i> Extremo apical	Planta <i>in vivo</i>
Extracto 19	Acuoso	<i>Pachycereus schottii</i> Extremo basal	Planta <i>in vivo</i>
Extracto 26	MeOH	<i>Pachycereus schottii</i>	M19
Extracto 27	EtOH + HCL 3%	<i>Stenocereus pruinosus</i>	M12
Extracto 28	EtOH + HCL 3%	<i>Stenocereus pruinosus</i>	M6
Extracto 29	EtOH + HCL 3%	<i>Stenocereus pruinosus</i>	M7
Extracto 31	EtOH + HCL 3%	<i>Stenocereus pruinosus</i>	M18

7.8 Análisis estadístico

En cuanto a la evaluación de la respuesta morfogénica de los medios de cultivo elaborados, se realizó un análisis de normalidad de Kolmogorov Smirnov y posteriormente un análisis de Kruskal-Wallis para concluir si existe diferencia significativa entre los tratamientos.

El análisis de datos se llevó a cabo con el método estadístico Probit para las pruebas de actividad biológica, calculando la concentración inhibitoria media en *Artemia salina*.

8. RESULTADOS

A continuación se muestran los resultados obtenidos en los diferentes ensayos.

8.1 Rendimiento de extractos *in vitro*

8.1.1 Rendimiento de extractos de callo *in vitro*

La Tabla V muestra los resultados del rendimiento obtenido de los extractos de callo de ambas especies así como el solvente empleado y del medio de cultivo de donde se cultivaron. Siendo el de mayor rendimiento el extracto metanólico cultivado en el medio 19 de *P. schottii*, con 11.3 g, y el de menor el extracto metanólico cultivado en el medio 4 de *P. schottii* con 0.15 g.

Tabla V. Rendimiento de callo en gramos			
Extracto/Especie	Solvente	Origen	g
1-- <i>S. pruinosus</i>	MeOH	M8	2.347
2-- <i>P. schottii</i>	MeOH	M4	8.162
3-- <i>S. pruinosus</i>	MeOH	M7	4.818
4-- <i>S. pruinosus</i>	Hexano	M8	2.347
6-- <i>P. schottii</i>	Hexano	M4	8.162
7-- <i>S. pruinosus</i>	MeOH	M18	8.170
8-- <i>P. schottii</i>	MeOH	M4	0.154
9-- <i>P. schottii</i>	MeOH	2, 4, D (2 mg/mL)	1.000
11-- <i>P. schottii</i>	MeOH	M18	6.285
26-- <i>P. schottii</i>	MeOH	M19	11.339
30-- <i>P. schottii</i>	EtOH + HCL 3%	M18	6.285
31-- <i>S. pruinosus</i>	EtOH + HCL 3%	M18	4.502

8.1.2 Rendimiento de extractos de brote *in vitro*

En cuanto a los rendimientos de los extractos de brote de ambas especies así como el solvente empleado y del medio de cultivo de donde se cultivaron, los resultados se muestran en la Tabla VI. Siendo el de mayor rendimiento el extracto metanólico cultivado en el medio 12 de *S. pruinosus*, con 49.5 g, y el de menor el extracto metanólico cultivado en el medio 6 de *P. schottii* con 0.15 g.

Tabla VI Rendimiento de brote pigmentado en gramos			
Extracto/Especie	Solvente	Origen	g
10-- <i>P. schottii</i>	MeOH	M6	0.154
15-- <i>S. pruinosus</i>	MeOH	M6	7.288
16-- <i>S. pruinosus</i>	MeOH	M7	1.977
17-- <i>S. pruinosus</i>	MeOH	M12	49.595
27-- <i>S. pruinosus</i>	EtOH + HCL 3%	M12	42.962
28-- <i>S. pruinosus</i>	EtOH + HCL 3%	M6	7.288
29-- <i>S. pruinosus</i>	EtOH + HCL 3%	M7	1.998

8.1.3 Obtención de extractos de planta *in vivo*

Se obtuvieron los siguientes rendimientos (Tabla VII) de los extractos metanólicos. Para *P. schottii* se obtuvo 3.4 % y para *S. pruinosus* se obtuvo 6.8 %. Para el fruto de *S. pruinosus* se obtuvo un rendimiento de 2.8%. Para el extracto de *S. pruinosus* etanólico acidificado (3% de HCL) se obtuvo 3.4 %.

Tabla VII Rendimiento en % obtenido para los extractos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>			
Especie	Medio de cultivo donde se obtuvo el explante	Solvente empleado	Rendimiento en porcentaje
<i>S. pruinosus</i>	M8	MeOH	12.7311
<i>P. schottii</i>	M4	MeOH	1.3734
<i>S. pruinosus</i>	M7	MeOH	2.0025
<i>S. pruinosus</i>	M8	Hexano	30.1874
<i>P. schottii</i>	M4	Hexano	3.8923
<i>S. pruinosus</i>	M18	MeOH	8.1700
<i>P. schottii</i>	M6	MeOH	0.154
<i>P. schottii</i>	2, 4, D (2 mg/mL)	MeOH	7.0500
<i>P. schottii</i>	M6	MeOH	0.154
<i>P. schottii</i>	M18	MeOH	12.5202

<i>S. pruinosus</i>	Fruto	MeOH	2.8493
<i>S. pruinosus</i>	Planta	MeOH	3.4052
<i>P. schottii</i>	Planta	MeOH	3.4660
<i>S. pruinosus</i>	M6	MeOH	3.4522
<i>S. pruinosus</i>	M7	MeOH	2.4424
<i>S. pruinosus</i>	M12	MeOH	89.1398
<i>P. schottii</i>	Planta extremo apical	Acuoso	1.6
<i>P. schottii</i>	Planta extremo basal	Acuoso	1.6
<i>P. schottii</i>	M19	MeOH	0.4670
<i>S. pruinosus</i>	M12	EtOH + HCL 3%	2.2840
<i>S. pruinosus</i>	M6	EtOH + HCL 3%	2.2990
<i>S. pruinosus</i>	M7	EtOH + HCL 3%	7.1370
<i>P. schottii</i>	M18	EtOH + HCL 3%	0.6872
<i>S. pruinosus</i>	M18	EtOH + HCL 3%	18.9626
<i>S. pruinosus</i>	Planta	EtOH + HCL 3%	3.4104

8.2 Respuesta morfogénica

En la Tabla VIII se muestran los resultados de la respuesta morfogénica de los explantes sembrados en los diferentes medios de cultivo, donde se puede apreciar desde la formación de callo con diferentes pigmentaciones, brotes, enraizamiento, desarrollo de areolas o nula respuesta.

Tabla VIII Respuesta morfogénica de los explantes ante los diferentes tratamientos			
Medio de cultivo	Regulador de crecimiento (mg/L)	Especie	Respuesta
M1	IBA 0.5 + BAP 1.0	<i>P. schottii</i>	Formación de raíces, algunos explantes pigmentados, formación de areolas y se observa múltiple brotación.
M2 Líquido	IBA 0.5 + BAP 1.0	<i>P. schottii</i>	No se observó cambio alguno, al cabo de 1 mes y por esto fue desechado.
M3	2,4,D. 2.0	<i>P. schottii</i>	Raíces abundantes y largas, con gran cantidad

			de pelos radicales.
M4	ANA 0.5	<i>P. schottii</i> y <i>S. pruinosus</i>	<i>P. schottii</i> : Proliferación de callo. Raíz muy larga y única. <i>S. pruinosus</i> : Formación de raíces largas y ramificadas.
M5	Sin reguladores	<i>P. schottii</i> y <i>S. pruinosus</i>	Medio empleado para mantener la proliferación del cultivo de ambas especies.
M6	K 1.0	<i>S. pruinosus</i>	Formación de pigmento, algunos explantes con poca formación de callo en la región del corte.
M7	2,4,D. 1.0 + K 0.5	<i>S. pruinosus</i>	Raíces muy cortas y engrosadas, poca formación de callo en algunos explantes, además de pigmento y múltiple brotación.
M8	2,4, D. 2.0 + K 1.0	<i>S. pruinosus</i>	Raíces abundantes, cortas y engrosadas, brotación múltiple. Formación de callo en algunos explantes.
M9	2,4, D. 0.22 + K 0.22	<i>S. pruinosus</i>	Formación de pigmento, y raíces engrosadas.
M10	2,4, D. 2.22 + K 2.22	<i>S. pruinosus</i>	Formación de pigmento, que se dispersó en el medio de cultivo.
M11	2,4, D. 4.0 + K 4.0	<i>S. pruinosus</i>	Formación de pigmento.
M12	Smith 2,4,D 0.11 + BAP 10.0	<i>P. schottii</i> y <i>S. pruinosus</i>	<i>P. schottii</i> : Areolas hinchadas y engrosadas, algunos explantes se diferenciaron a callo y con el tiempo forman brotes. <i>S. pruinosus</i> : Formación de callo en la región de corte.
M13	ANA 1.0	<i>P. schottii</i> y <i>S. pruinosus</i>	<i>P. schottii</i> : Formación de raíces largas y anchas con escasa formación de callo. <i>S. pruinosus</i> : Solo algunos explantes con formación de raíces y pigmento.
M14	ANA 2.0 + BAP 0.1	<i>P. schottii</i> y <i>S. pruinosus</i>	<i>P. schottii</i> : Pocos explantes presentaron escasa pigmentación. <i>S. pruinosus</i> : Abundante formación de raíces largas y gruesas.
M15	Smith 2,4,D 0.22 + BAP 10.0	<i>P. schottii</i> y <i>S. pruinosus</i>	<i>P. schottii</i> : Escasa formación de callo en región de corte y areolas hinchadas.

			<i>S. pruinosus</i> : Pigmentado en región de corte, poca formación de callo.
M16	2,4, D. 5.0 + K 0.25	<i>P. schottii</i> y <i>S. pruinosus</i>	<i>P. schottii</i> : Formación de raíces, oxidación escasa. <i>S. pruinosus</i> : Solo un explante desarrolló escaso callo en la región del corte, los otros explantes se pigmentaron.
M17	K 4.0 + AIA 2.0	<i>P. schottii</i> y <i>S. pruinosus</i>	<i>P. schottii</i> : Explantes con enrrollamiento y formación de callo en la región de corte. <i>S. pruinosus</i> : Escasa formación de callo en la región de corte, todos los explantes se observan muy pigmentados.
M18	ANA 0.1 + BAP 2.0	<i>P. schottii</i> y <i>S. pruinosus</i>	Para ambas especies, gran proliferación de callo en la región de corte. Además para <i>S. pruinosus</i> producción de pigmento.
M19	AIA (0.9) + BAP (0.9) + Hemisulfato de adenina (2)	<i>P. schottii</i> y <i>S. pruinosus</i>	Para <i>P. schottii</i> , formación de callo color amarillo en la región de corte. <i>S. pruinosus</i> : formación de callo en herida expuesta y pigmento en algunos explantes.
M20	ANA 4 + Antioxidantes	<i>P. schottii</i> y <i>S. pruinosus</i>	<i>P. schottii</i> : Explantes no reaccionaron al medio de cultivo. <i>S. pruinosus</i> : formación de pigmentos, algunos explantes presentan oxidación.

En las figuras siguientes se muestra la respuesta morfogénica para cada uno de los tratamientos probados para *Pachycereus schottii*: En la figura 5 el tratamiento M1, se muestra brotación y desarrollo de raíces, la figura 6 corresponde a el tratamiento M3 dio como resultado la formación de abundantes raíces y pelos radiculares, la figura 7, perteneciente al tratamiento M4, se observa la formación de callo en la región de corte del explante, en la figura 8, se observa la proliferación del cultivo, perteneciente este tratamiento al M5, la figura 9 muestra la diferenciación a brotes, en el medio M12, la figura 10 correspondiente al tratamiento M13 muestra la formación de raíces largas y anchas, la figura 11, muestra la formación de pigmento en la región de corte siendo esta

del tratamiento M14, la figura 12, muestra las areolas hinchadas para el tratamiento M15, la figura 13 correspondiente al tratamiento M16, muestra la formación de raíces, en la figura 14, se observan los explantes enrrollados y formación de callo en herida expuesta, perteneciendo este al tratamiento M17, en la figura 15 perteneciente al tratamiento M18, se observa gran formación de callo en la región de corte que no está en contacto con el medio de cultivo, en la figura 16, se observa gran proliferación de callo, pertenece al tratamiento M19, los explantes sembrados en el tratamiento M20, no tuvieron cambios.



Fig. 5 *P. schottii* en M1, se observa el desarrollo de raíces largas ligeramente engrosadas, areolas y brotación.

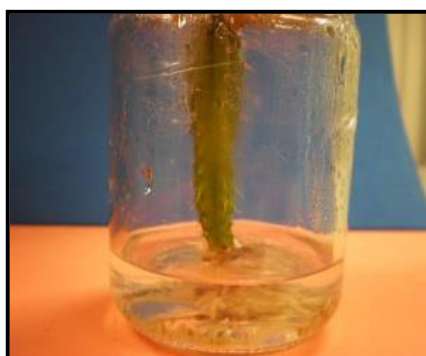


Fig. 6 *P. schottii* en M3. Raíces muy abundante y larga, con gran cantidad de pelos radicales.



Fig. 7 *P. schottii* en M4. Formación de callo en la región de corte.



Fig. 8 *P. schottii* en M5. Germinación y proliferación del cultivo.



Fig. 9 *P. schottii* en M12. Abundantes brotes diferenciados.



Fig. 10 *P. schottii* en M13. Formación de raíces anchas y largas.



Fig.11 *P. schottii* en M14 presencia de pigmento, en la región de corte expuesta.



Fig. 12 *P. schottii* en M15 con areolas hinchadas.



Fig. 13 *P. schottii* en M16 formación de raíces.



Fig. 14 *P. schottii* en M17 enrrolamiento de explante y formación de callo en herida expuesta.



Fig. 15 *P. schottii* en M18 gran proliferación de callo en zona de la herida.

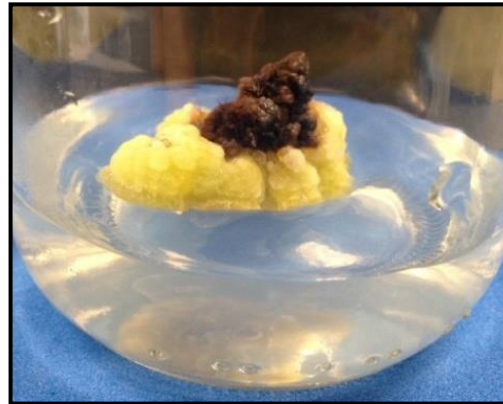


Fig. 16 *P. schottii* en M19. Presencia de callo en la región de corte.

La respuesta morfogénica para cada uno de los tratamientos probados para *Stenocereus pruinosus*, se manifestó de diversas formas. En la figura 17, tratamiento M5, se observa la proliferación del explante, con formación de raíces y desarrollo areolar, la figura 18, donde se puede apreciar la formación de pigmento, incluso suspendido en el medio de cultivo, y que corresponde al tratamiento M6. Mientras que para el tratamiento M7, figura 19, se observa la formación de raíces cortas y anchas, además de pigmento y brotación múltiple. La figura 20, tratamiento M8, muestra la formación de raíces engrosadas, además de brotación múltiple. En los tratamientos M9, M10 y M11, correspondientes a las figuras 21, 22, 23 y 26, se observa la formación de pigmento en la región de corte. Otros explantes además de la formación de pigmento hubo una dediferenciación a callo como en los tratamientos M12, M15, M17, M18, M19, que corresponden a las figuras 24, 25, 27, 30 y 31. Los explantes colocados en el medio M20 correspondiente a la figura 31, produjeron pigmento, pero también desarrollaron oxidación.



Fig. 17 *S. pruinosus* en M5 formación de raíces y desarrollo de areolas.



Fig. 18 *S. pruinosus* en M6 pigmento suspendido en el medio.



Fig. 19 *S. pruinosus* en M7 formación de raíces cortas y anchas, pigmento y brotación múltiple.



Fig. 20 *S. pruinosus* en M8 formación de raíces cortas y engrosadas y brotación múltiple.



Fig. 21 *S. pruinosus* en M9 con formación de pigmento en región de corte.



Fig. 22 *S. pruinosus* en M10 pigmento disperso en el medio.



Fig. 23 *S. pruinosus* en M11, formación de pigmento



Fig. 24. *S. pruinosus* en M12. Con formación de callo pigmentado en la región de corte.



Fig. 25 *S. pruinosus* en M15. Formación de callo y pigmento en herida expuesta.

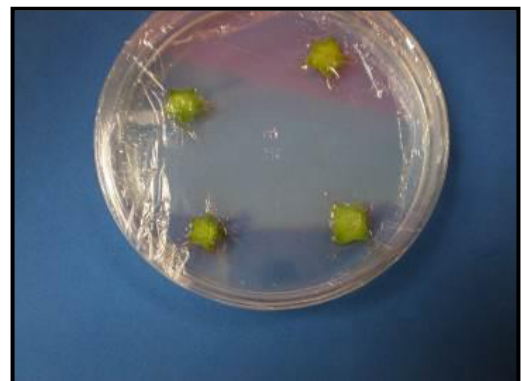


Fig. 26. *S. pruinosus* en M16. Explantes pigmentados



Fig. 27. *S. Pruinosus* en M17. Formación de callo en región de corte y pigmento.



Fig. 28. *S. pruinosus* en M18. Callo en región de corte y pigmento.

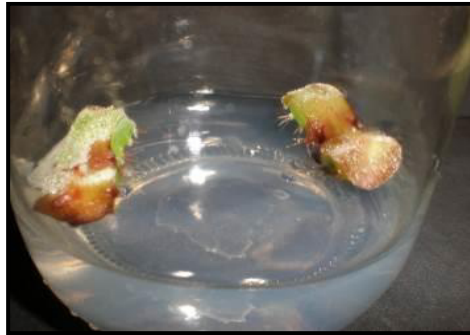


Fig. 29. *S. pruinosus* en M19. Con formación de callo y pigmento en herida expuesta.

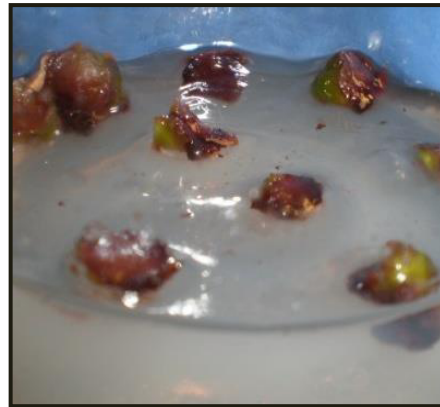


Fig. 30 *S. pruinosus* en M20. Explantes pigmentados y con oxidación.

8.3 Análisis estadístico para respuesta morfogénica

La normalidad fue comprobada mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y posteriormente por la prueba de Kruskal-Wallis para *P. schottii* fueron evaluados los tratamientos M1, M4, M12, M13, M15, M17 y M18, y para *S. pruinosus* fueron evaluados los tratamientos M4, M6, M7, M8, M10, M12, M17, M18, demostrando cuales tratamientos fueron diferentes significativamente. (Tabla IX).

Tabla IX. Análisis estadístico de la respuesta morfogénica para <i>P schottii</i> y <i>S. pruinosus</i>				
Respuesta morfogénica	Significancia <i>P. schottii</i>	Desv. Std <i>P. schottii</i>	Significancia <i>S. pruinosus</i>	Desv. Std <i>S. pruinosus</i>

Brote	.000	± .215	.193	± .340
Raíz	.004	± .377	.000	± .309
Pelos radicales	.815	± .120	.059	± .094
Pigmento	.000	± .276	.000	± .501
Callo	.000	± .501	.105	± .496
Areolas	.000	± .244	.023	± .216

Para *Pachycereus schottii*, la producción de pigmento, desarrollo de brote, diferenciación de callo y areolas en proceso de diferenciación a callo, son diferentes significativamente; para la producción de raíces existe diferencia no significativa y para la producción de pelos radicales no existió diferencia (figuras 31-36). En cuanto a *Stenocereus pruinosus* la producción de raíz y pigmento los tratamientos son diferentes significativamente, mientras que para la producción de areolas en proceso de diferenciación de callo, los tratamientos fueron diferentes y para la producción de brotes, pelos radicales y callo, no lo fueron. A continuación se muestran las figuras (37-42) de cada variable evaluada.

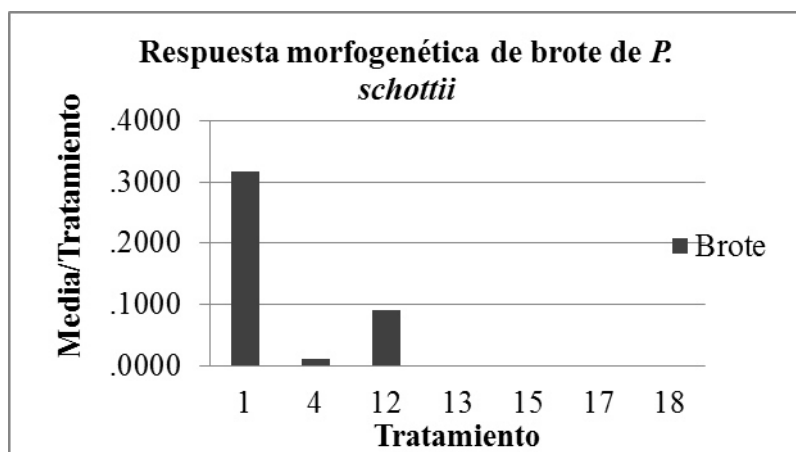


Fig. 31 Influencia de auxinas y citocininas en la formación de brote.

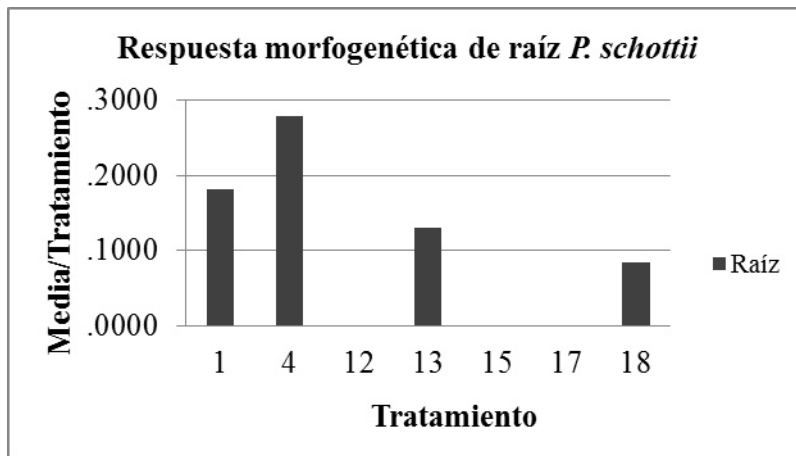


Fig. 32 Influencia de auxinas y citocininas en la formación de raíces.

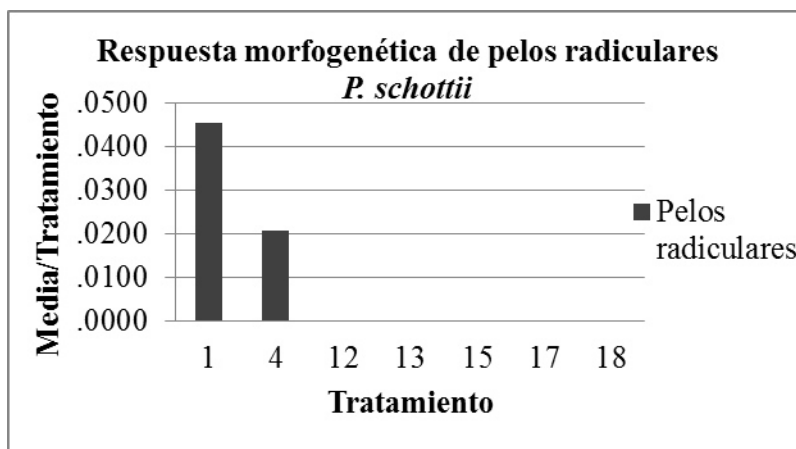


Fig. 33 Influencia de auxinas y citocininas en la formación de pelos radiculares.

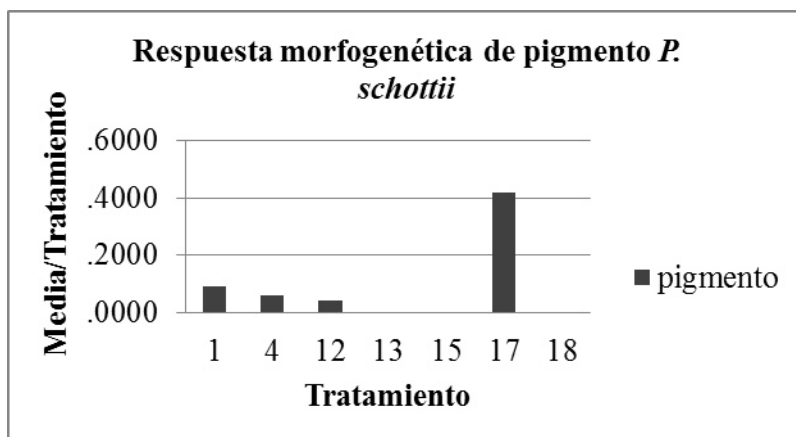


Fig. 34 Influencia de auxinas y citocininas en la formación de pigmento.

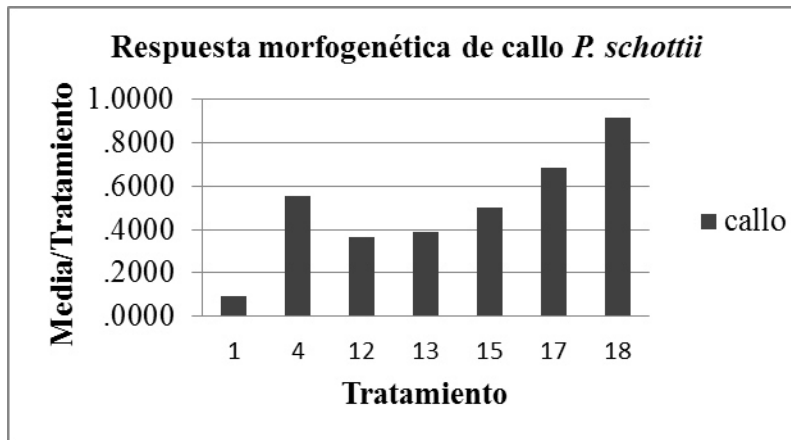


Fig. 35 Influencia de auxinas y citocininas en la formación de callo.

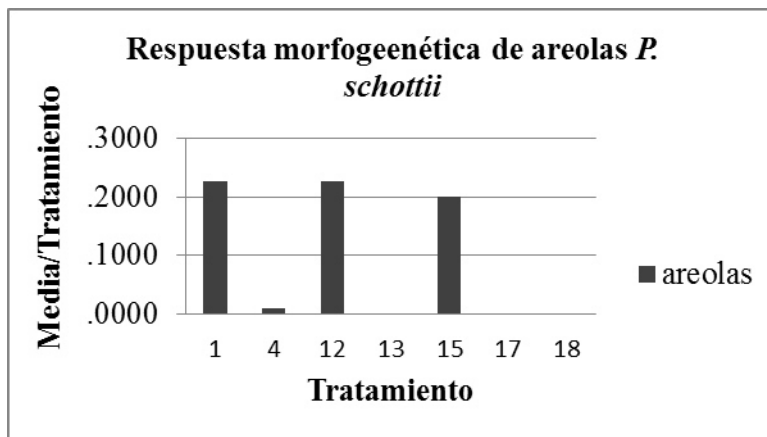


Fig. 36 Influencia de auxinas y citocininas en la formación de areolas.

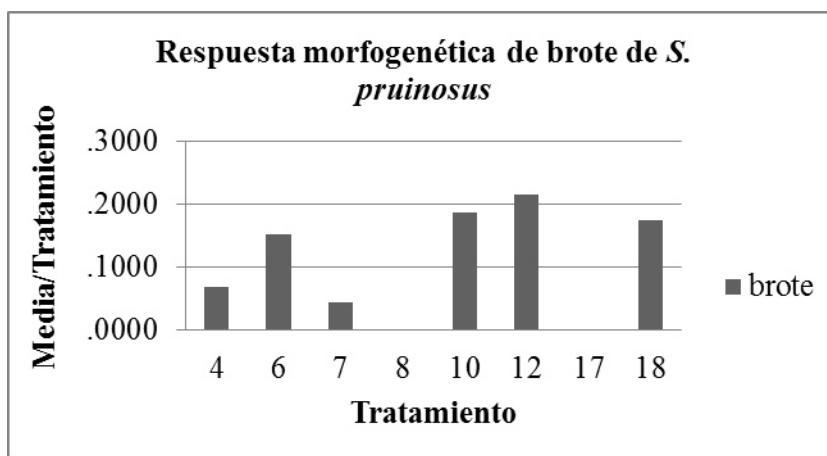


Fig. 37 Influencia de auxinas y citocininas en la formación de brote.

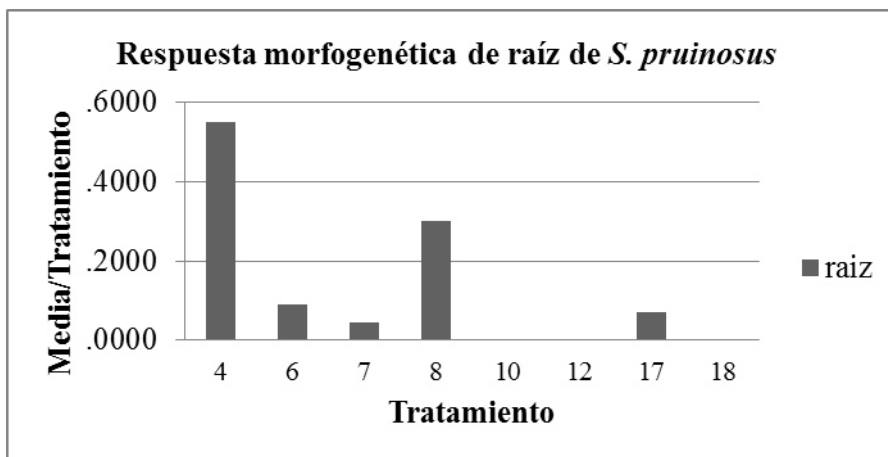


Fig. 38 Influencia de auxinas y citocininas en la formación de raíz.

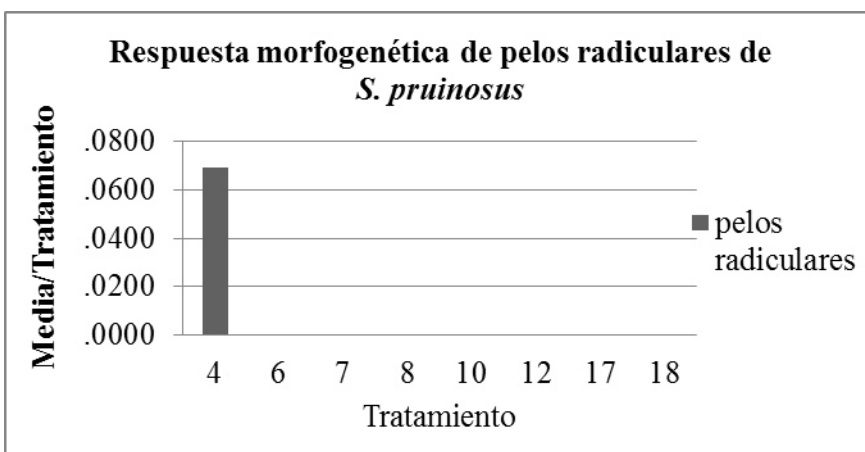


Fig. 39 Influencia de auxinas y citocininas en la formación de pelos radiculares.

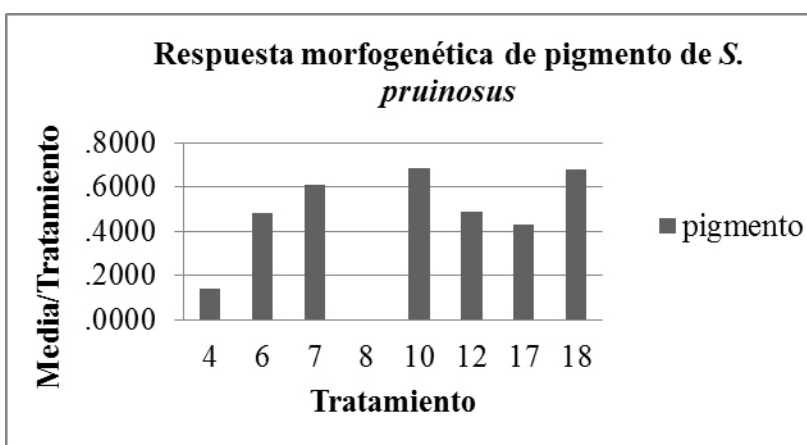


Fig. 40 Influencia de auxinas y citocininas en la formación de pigmento.

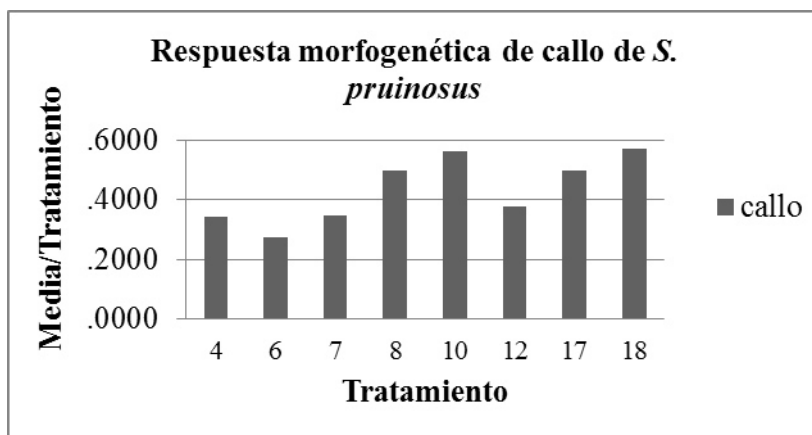


Fig. 41 Influencia de auxinas y citocininas en la formación de callo.

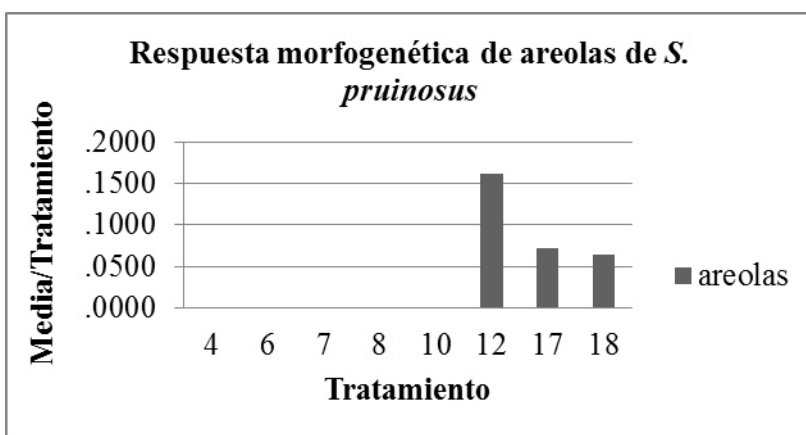


Fig. 42 Influencia de auxinas y citocininas en la formación de areolas.

8.4 Pruebas de tamizaje fitoquímico

8.4.1 Pruebas fitoquímicas de extractos metanólicos in vitro

Las pruebas de tamizaje fitoquímico que resultaron positivas, para los extractos metanólicos de callo, se presentan en la Tabla X.

Tabla X. Pruebas para la determinación de grupos funcionales en extractos metanólicos

Extracto	<i>S.p.</i> en	<i>P.s.</i> en	<i>S.p.</i> en	<i>P.s.</i> en	<i>P.s.</i> en	<i>P.s.</i> en	<i>S.</i> <i>p.</i>	<i>P.s.</i>	<i>S.p.</i> en	<i>P.s.</i> en	<i>S.p.</i> en	<i>S.p.</i> en
Pruebas químicas	M8 (1)	M4 (2)	M7 (3)	M4 (8)	(9)	M18 (11)	planta (13)	planta (14)	M12 (17)	M19 (26)	M12 (27)	M18 (31)
Instauraciones KMnO4	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Grupo carbonilo	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+
Lieberman- Burchard	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Molish	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Flavonoides H2SO4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
				Chalcona	Chalcona							
Bicarbonato de sodio	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Salkowski para saponinas	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
Shinoda	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Lactonas	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+
Oxidilos fenólicos	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-

Cumarinas	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Baljet	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
Agitación	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Aromaticidad	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+

8.4.2 Pruebas fitoquímicas de extractos hexánicos *in vitro*

Las pruebas de tamizaje fitoquímico que resultaron positivas, para los extractos hexánicos *in vitro*, se presentan en la Tabla XI

Tabla XI Pruebas para la determinación de grupos funcionales extractos hexánicos (*in vitro*)

Pruebas químicas	<i>S. pruinosus</i> M8 (ext. 4)	<i>S. pruinosus</i> M7 (ext. 3)	<i>P. schottii</i> M4 (ext. 6)
Molish para carbohidratos	+	+	+
H ₂ SO ₄ Ac. Sulfúrico (flavonoides)	+	+	+
Bicarbonato de sodio	+	+	+
Salkowski para saponinas	+	+	-
Ac sulfúrico Formaldehído	+	+	+
Lactonas	+	+	+

8.4.3 Pruebas fitoquímicas del extracto etanólico acidificado (EtOH + HCl 3%) de *S. pruinosus in vivo*

Las pruebas de tamizaje fitoquímico que resultaron positivas, para el extracto etanólico acidificado de *S. pruinosus* se presentan en la Tabla XII.

Tabla XII Pruebas de tamizaje fitoquímico, extracto etanólico acidificado de <i>S. pruinosus</i>	
Metabolito	Extracto acidificado de <i>S. pruinosus</i>
Cumarinas	+
Flavonoides (prueba de H ₂ SO ₄)	+
	Rojizo (quinonas)
Shinoda	+

Alcaloides	+
Salkowski	+
Aromaticidad	+

8.5 Actividad biológica

8.5.1 Toxicidad sobre *A. salina*

Los resultados más relevantes del ensayo sobre *Artemia salina* se muestran en la Tabla XIII, los extractos probados en su mayoría mostraron DL₅₀ por arriba de los 1000 µg/ml, lo cual según Lagarto Parra *et al.*, (2001), son extractos no tóxicos; sin embargo cinco de los extractos obtuvieron DL₅₀ menores a 1000 µg/ml, siendo estos una posible fuente de compuestos bioactivos.

Tabla XIII Resultados del ensayo sobre <i>A. salina</i>	
Extracto	DL ₅₀ (µg/mL)
<i>P. schottii</i> M19 en MeOH	282.240
<i>S. pruinosus</i> M12 en EtOH + HCL 3%	735.54
<i>S. pruinosus</i> M7 en EtOH + HCL 3%	946.78
<i>S. pruinosus</i> M18 en EtOH + HCL 3%	152.45
<i>S. pruinosus</i> de planta en EtOH + HCL 3%	79.64

8.5.2 Actividad antibacteriana

8.5.2.1 Tinción de Gram

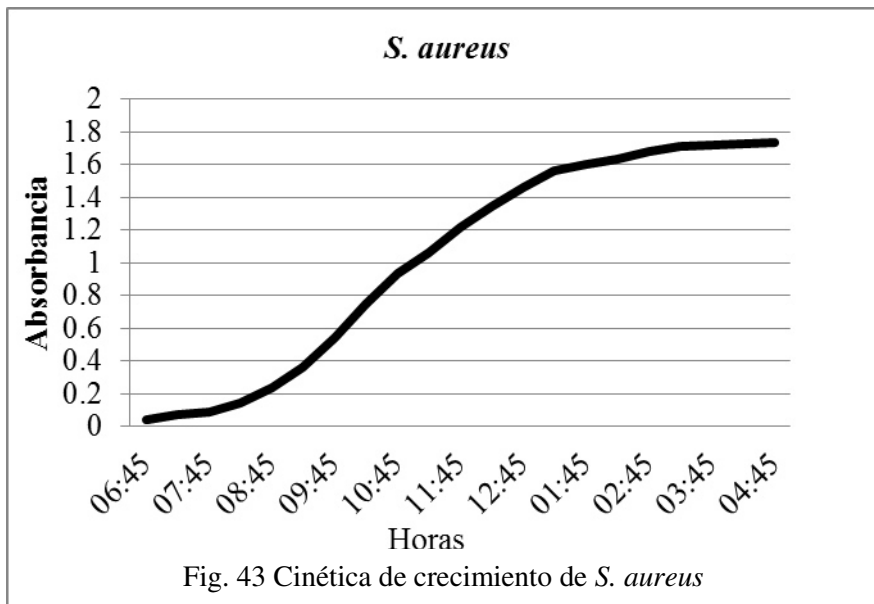
Para la identificación preliminar de las bacterias se utilizó la tinción gram, en la cual se obtuvieron los siguientes resultados, los cuales son anexados en la Tabla XIV.

Tabla XIV. Resultado de la tinción Gram.	
Bacteria	Resultado
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram positiva
<i>Salmonella typhimurium</i>	Gram negativa
<i>Listeria monocytogenes</i>	Gram positiva
<i>Escherichia coli</i>	Gram negativa
<i>Bacillus cereus</i>	Gram positiva
<i>Enterobacter faecalis</i>	Gram positiva

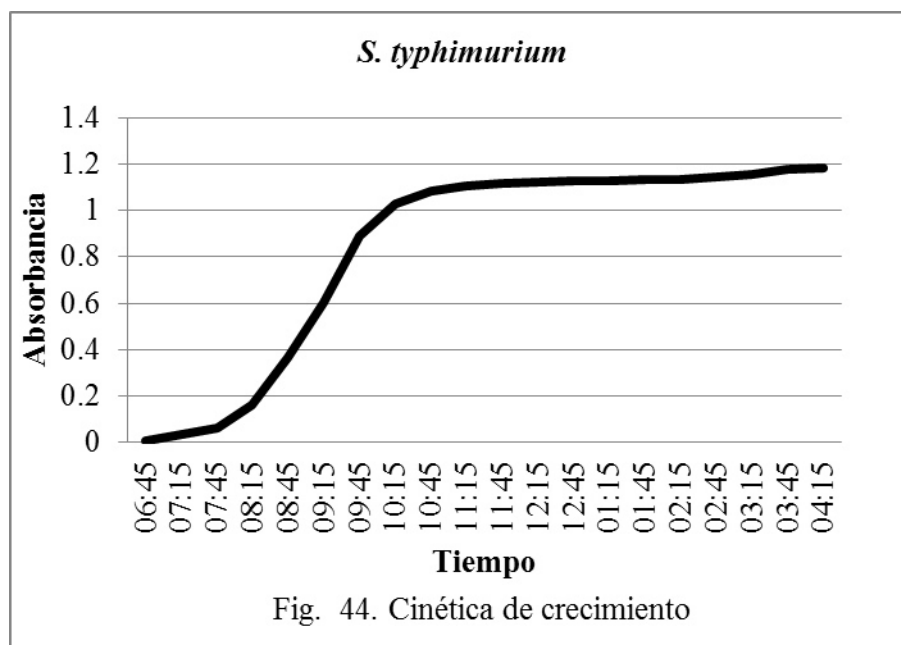
8.5.2.2 Cinética bacteriana

La cinética bacteriana implica el cálculo del número de células que existen en una suspensión. Para las diferentes cepas bacterianas se realizó este proceso y los resultados se presentan a continuación.

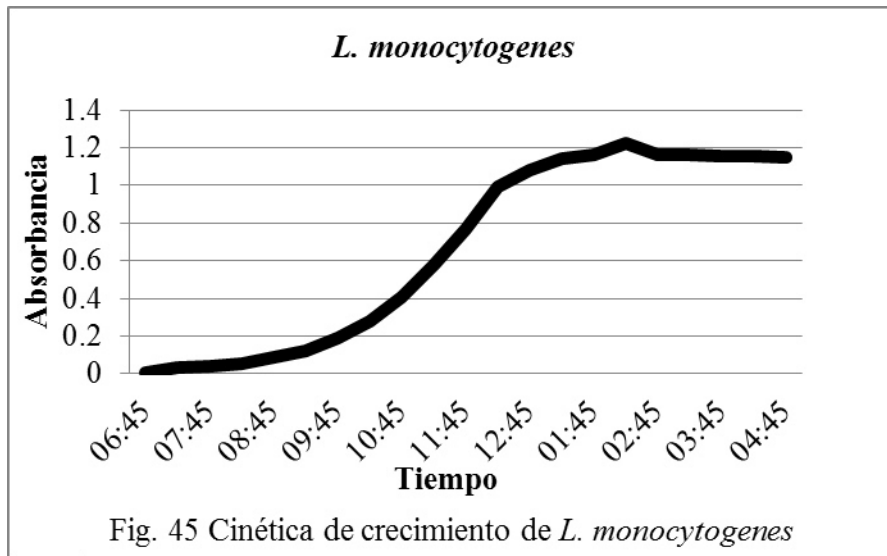
Staphylococcus aureus inicia la fase logarítmica a las 2h de realizar la siembra, y llega a la estacionaria a las 7h. En la fig. 43 se muestra la gráfica con la cinética de crecimiento.



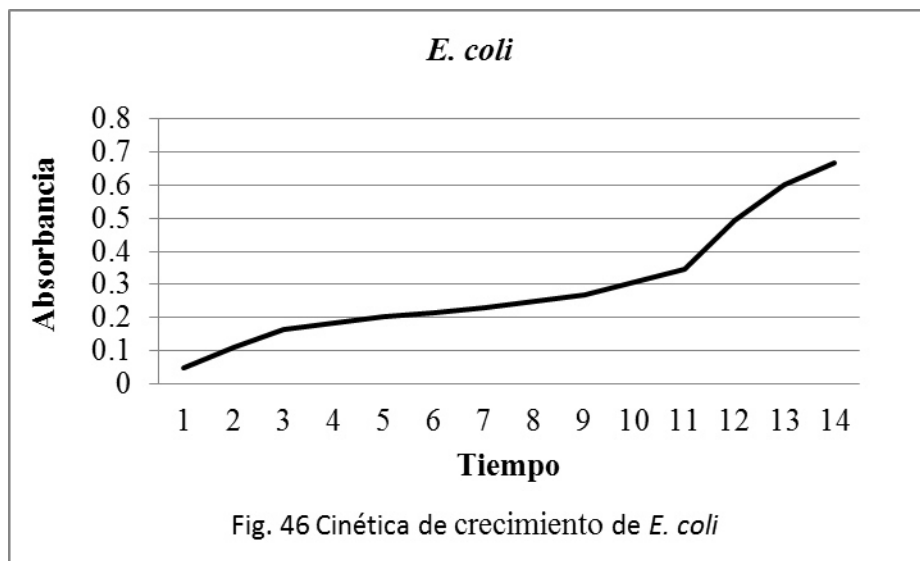
Salmonella typhimurium inicia la fase logarítmica a la hora de realizar la siembra, y llega a la estacionaria a las 3 horas de sembrar el inóculo. En la fig. 44 se muestra la gráfica con la cinética de crecimiento.



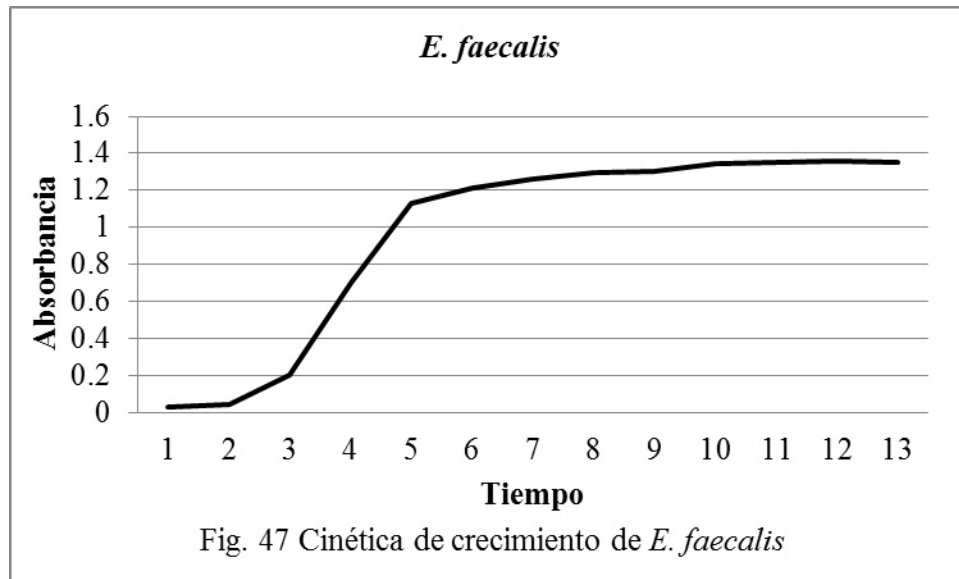
Listeria monocytogenes inicia la fase logarítmica a las 3h de realizar la siembra, y llega a la estacionaria a las 8 horas de sembrar el inóculo. En la fig. 45 se muestra la gráfica con la cinética de crecimiento.



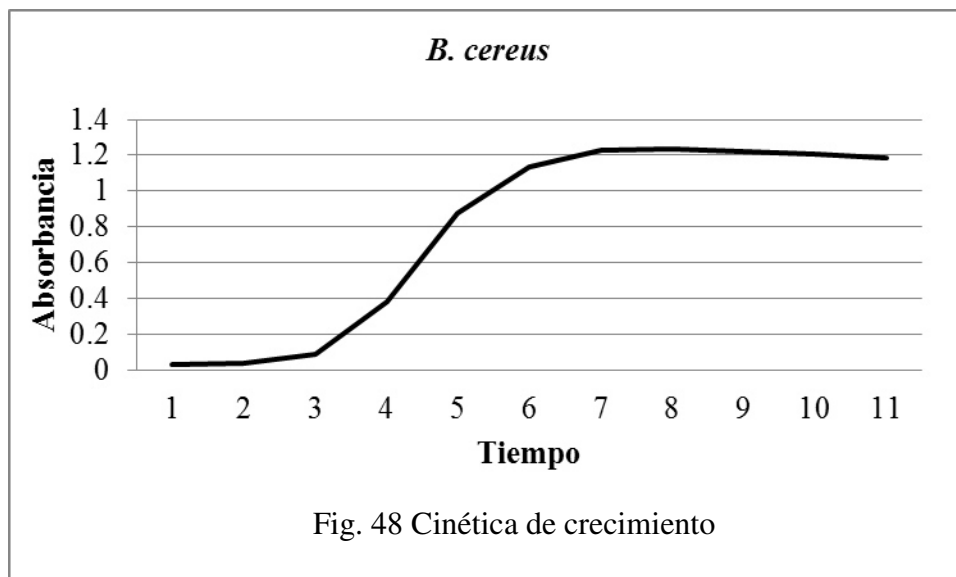
En la figura 46 se muestra la gráfica con la cinética de crecimiento de *E. coli*, la cual presenta una fase logarítmica muy larga no llegando al periodo estacionario.



Enterobacter faecalis inicia la fase logarítmica a las 2h de realizar la siembra, y llega a la estacionaria a las 5h de sembrar el inóculo. En la fig. 47 se muestra la gráfica con la cinética de crecimiento.



Bacillus cereus inicia la fase logarítmica a las 3h de realizar la siembra, y llega a la estacionaria a las 7 horas de sembrar el inóculo. En la fig. 48 se muestra la gráfica con la cinética de crecimiento.



8.5.2.3 Actividad bactericida

En cuanto a la determinación de la actividad antibacteriana de los extractos probados, los resultados se muestran en la Tabla XIV, observándose que el extracto con el mayor halo de inhibición fue el extracto metanólico, perteneciente a *S. pruinosus* proveniente del medio de cultivo M8 (fig. 49) y el extracto hexánico de *P. schottii* obtenido del medio de cultivo M4 para *S. aureus* y *S. typhimurium* (fig. 50) respectivamente. Después de estos, los extractos más activos se observan con un halo de inhibición de 1.2 cm tanto (extracto metanólico de *P. schottii* en medio M4) para *S. aureus* (fig. 51) como para *E. coli* (extracto hexánico de *P. schottii* obtenido del medio de cultivo M4), siendo este último bacteriostático.

Tabla XV. Actividad antibacteriana de los extractos probados de ambas especies						
Bacteria	Halo de inhibición en cm. de <i>P. schottii</i>	Halo de inhibición en cm. de <i>S. pruinosus</i>	No. De extracto de <i>P. schottii</i>	No. De extracto de <i>S. pruinosus</i>	Control (-) solvente	Control (+) Gentamicina
<i>S. aureus</i>	1.2	1.4 solo 1 repetición	2	1	0	2.36
<i>S. aureus</i>		0.8		4	0	2.36
<i>S. aureus</i>	0.76		8		0	2.36
<i>S. aureus</i>	0.9 bacteriostático		10		0	2.36
<i>S. aureus</i>		0.75 bacteriostático		12	0	2.36
<i>S. aureus</i>		0.9 bacteriostático		17	0	2.36
<i>S. aureus</i>		0.8		13	0	2.36

<i>S. typhimurium</i>	0.9		2		0	1.9
<i>S. typhimurium</i>	1.47		6		0	1.9
<i>S. typhimurium</i>	1.0		6		0	1.9
<i>S. typhimurium</i>		0.8		16	0	1.9
<i>S. typhimurium</i>	0.9		19		0	1.9
<i>L. monocytogenes</i>		1.0		1	0	2.65
<i>L. monocytogenes</i>		0.95		15	0	2.65
<i>L. monocytogenes</i>		1.05		17	0	2.65
<i>E. coli</i>		0.9		4	0	1.9
<i>E. coli</i>	1.2 (bacteriostático)		6		0	1.9
<i>B. cereus</i>		0.97		4	0	3.25
<i>B. cereus</i>	1.07		6		0	3.25
<i>E. faecalis</i>	---	---	---	---	0	1.4

En La Figura 49, se observan los halos de inhibición sobre *S. aureus*, siendo el de mayor relevancia el extracto a) Metanólico de *S. pruinosus* proveniente de M8 con 1.4 cm de inhibición, como control negativo se utilizó el metanol (M) y como control positivo gentamicina (G).

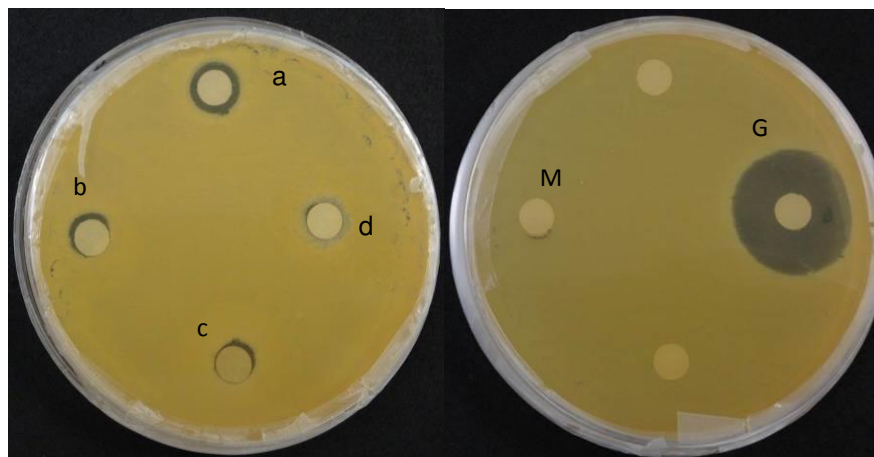


Fig. 49. Efecto inhibitorio de los extractos sobre *S. aureus* a) Extracto metanólico de *S. pruinosus* proveniente de M8, b) extracto hexánico de *P. schottii* proveniente de M4, c) extracto metanólico de *S. pruinosus* proveniente de M7, d) extracto hexánico de *S. pruinosus* proveniente de M8, control negativo M metanol, control positivo G gentamicina.

En La Figura 50, se observan los halos de inhibición sobre *S. typhimurium*, siendo el de mayor relevancia el extracto hexánico de *P. schottii* proveniente de M4, con 1.47 cm de inhibición, como control negativo se utilizó el metanol (M) y como control positivo gentamicina (G).

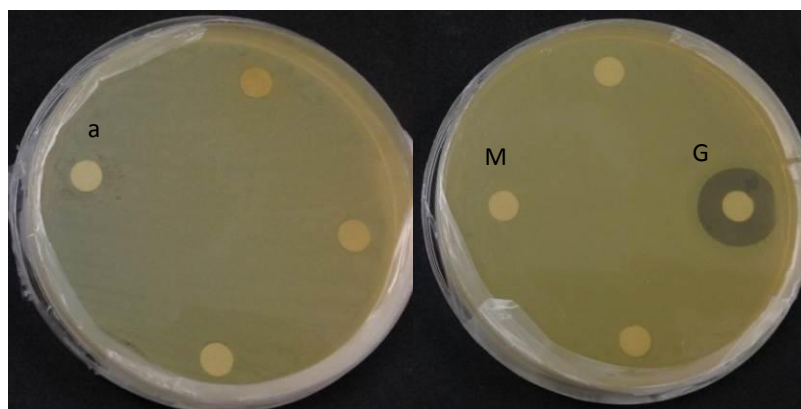


Fig. 50 Efecto inhibitorio de los extractos sobre *S. typhimurium* a) extracto hexánico de *P. schottii* proveniente de M4, control negativo M metanol, control positivo G gentamicina.

En La Figura 51, se observan los halos de inhibición sobre *E. coli*, siendo el de mayor relevancia el extracto hexánico de *P. schottii* proveniente de M4, con 1.2 cm de

inhibición, como control negativo se utilizó el metanol (M) y como control positivo gentamicina (G).

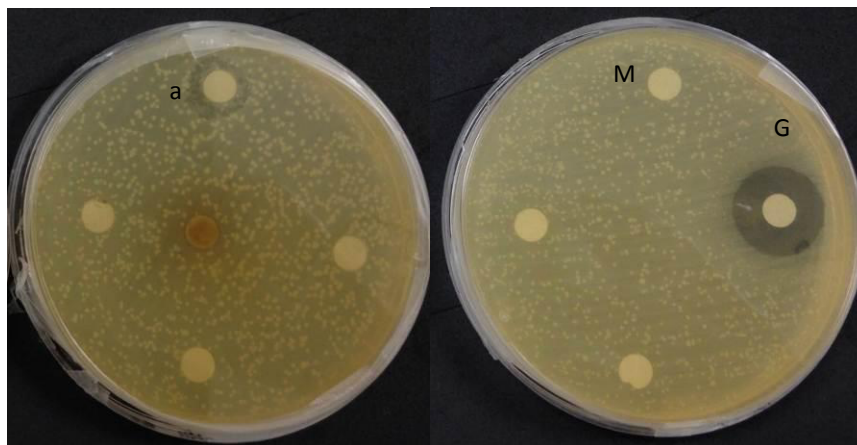


Fig. 51 Efecto inhibitorio de los extractos sobre *E. coli* a) extracto hexánico de *P. schottii* proveniente de M4, control negativo M metanol, control positivo G gentamicina.

8.4.3 Actividad antifúngica

En cuanto a la determinación de la actividad fungicida de los extractos probados, estos no mostraron inhibición en ninguna de las cepas probadas

8.5.3 Actividad Antioxidante

8.5.3.1. Método DPPH

En la Tabla XVI se muestran los resultados obtenidos para la actividad antioxidante de los extractos metanólicos en la reacción con DPPH, en donde se observa que el extracto metanólico perteneciente a *S. pruinosus* y el extracto de planta *in vivo* mostraron mejor actividad comparada con los demás extractos, teniendo una CE_{50} de 1.59 y 1.50 mg/mL respectivamente. En comparación con el control positivo (vitamina C) que fue de 14.86 mg/mL.

Tabla XVI. Actividad antioxidante por el método del DPPH			
Extracto metanólico	Especie	Origen	CE ₅₀ (µg/mL)
Extracto 7	<i>S. pruinosus</i>	M18	1.59
Extracto 11	<i>P. schottii</i>	M18	3.7
Extracto 13	<i>S. pruinosus</i> Silvestre	---	13.16
Extracto 14	<i>P. schottii</i> Silvestre	---	1.50
Extracto 17	<i>S. pruinosus</i>	M12	4.9
Vitamina C	---	---	14.86

8.5.3.2. Actividad antioxidante por el método de decolorización ABTS

La figura 52 muestra la curva de trolox, donde se obtuvo una R^2 de 0.9467. Los equivalentes en trolox dieron como resultado 62.5 µg/mL.

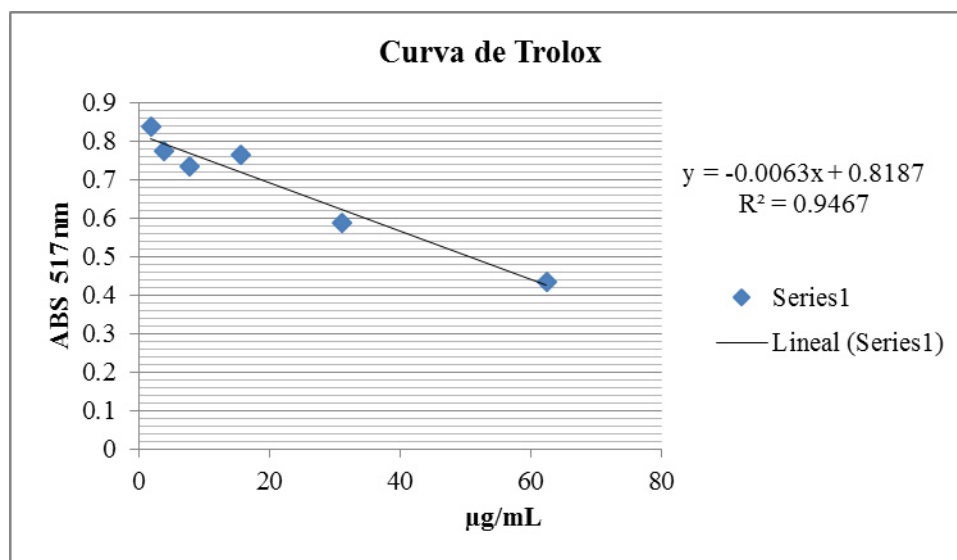


Fig. 52 Curva de equivalentes de trolox.

La Tabla XVII muestra los resultados para la prueba de descolorización de ABTS que mostraron actividad relevante, todos pertenecientes a *P. schottii*, ya que para *S. pruinosus* no lo fue.

Tabla XVII. Actividad antioxidante por el método de ABTS			
Extracto metanólico	Especie	Obtenido del medio	Eq. de trolox (µg/mL)
14	<i>Pachycereus schottii</i>	Planta silvestre	121.22
26	<i>Pachycereus schottii</i>	M19	122.75
18	<i>Pachycereus schottii</i>	Planta silvestre	123.44
19	<i>Pachycereus schottii</i>	Planta silvestre	123.39

8.5.3.3 Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

La siguiente figura (53) muestra la curva de los equivalentes de ácido gálico, donde se obtuvo una R^2 , de 0.9573

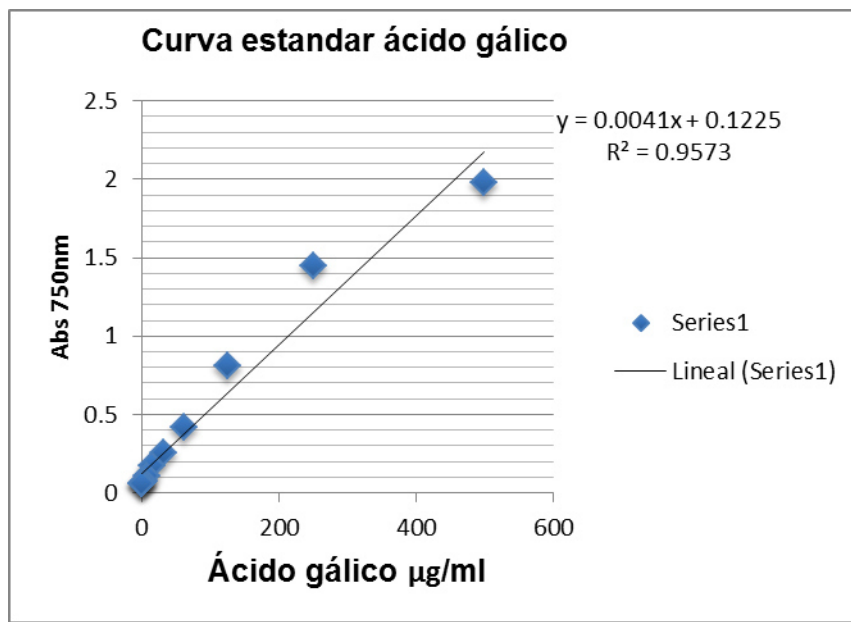


Fig. 53 Curva estándar de equivalentes de Ác. Gálico.

La Tabla XVIII muestra los resultados para la cuantificación de fenoles totales.

Tabla XVIII Cuantificación de fenoles totales			
Extracto metanólico	Especie	Obtenido del medio	Eq. Ác. Gálico (µg/mL)
Extracto 14	<i>Pachycereus schottii</i>	Planta silvestre	176.78
Extracto 26	<i>Pachycereus schottii</i>	M19	58.46
Extracto 18	<i>Pachycereus schottii</i>	Planta silvestre	129.81
Extracto 19	<i>Pachycereus schottii</i>	Planta silvestre	173.93

8.6 Cromatografía en capa fina

En el sistema Benceno: Acetona (9:1), los extractos de *S. pruinosus* en M8 (extracto 1), y el extracto de planta *in vivo* de *P. schottii* (extracto 14), se observó una banda morada, la cual indica la posible presencia de esterol, además se observan los resultados para los extractos de *S. pruinosus* en M8 hexánico (extracto 4) y *P. schottii* en M4 hexánico (extracto 6) donde se revela la posible presencia de aceites (figura 54).

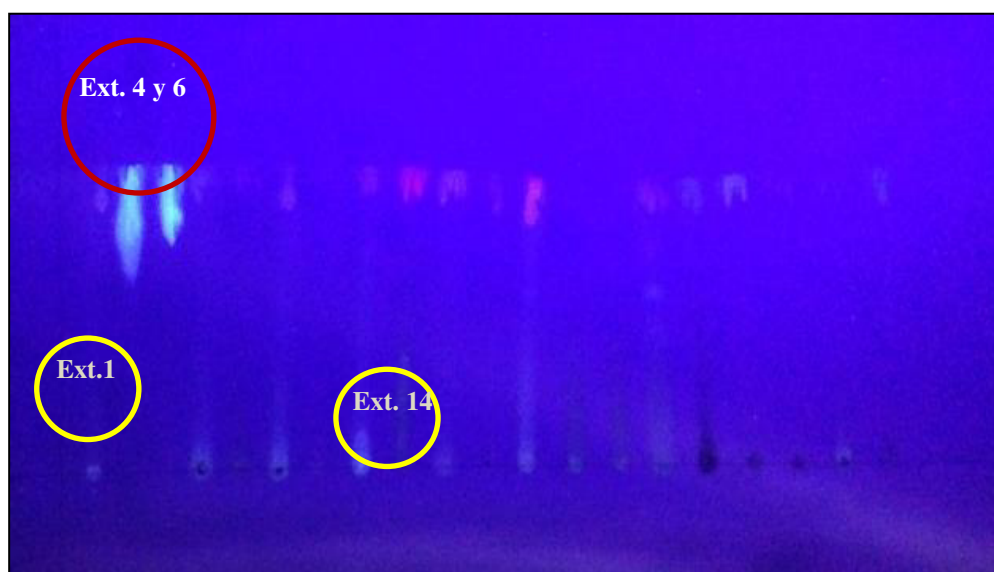


Fig. 54. Cromatografía en capa fina. Extracto 1 y 14 se observa la presencia de esterol, en el extracto 4 y 6 la presencia de aceites. Las manchas rojas son distintos tipos de clorofila.

9. DISCUSIÓN

El propósito principal de este trabajo fue implementar el cultivo *in vitro* de *P. schottii* y *S. pruinosus* y confirmar algunas de las propiedades reportadas en las plantas silvestres comparándolos con los extractos obtenidos del cultivo *in vitro*.

En cuanto a la respuesta morfogénica para *P. schottii* se observa que en el medio M1, con IBA y BAP, se logra el desarrollo de abundantes raíces, brotes y areolas, por otro lado García-Rubio y Malda-Barrera, (2010) al utilizar estos reguladores del crecimiento, en diferente concentración obtuvieron abundante callo para *Mammillaria mathildae*, por lo que los resultados obtenidos difieren ya que este tejido indiferenciado no fue observado. Para el medio M3, adicionado con ác. 2-4, D, la respuesta observada fue la formación de abundantes raíces y pelos radiculares, contrario a lo reportado con Aparecida *et al.*, 1995, en *Cereus peruvianus* donde al adicionar este regulador de crecimiento obtienen formación de callo.

El desarrollo de raíces y callo es observado en la región de corte en los medios M4 y M13, estos resultados difieren con los reportados por Elías *et al.*, (2014) sobre *Echinocereus cinerascens*, quienes al adicionar esta auxina (ANA) al medio de cultivo obtienen formación de brotes. Con la adición de 2, 4, D y BAP (M12 y M15), las aréolas se desdiferencian a callo, concordando con Angulo-Bejarano y Paredes-López, (2011) en donde al adicionar al medio de cultivo estos reguladores obtienen proliferación de callo, en un cultivo de *Opuntia ficus-indica*. Con el uso de 2, 4, D y K se logró la formación de raíces, concordando con la reportada por Karimi *et al.*, (2010). La presencia de pigmento y callo es observada en el medio M17, donde se combinaron, auxinas y citocininas (AIA y K) estos resultados difieren con los obtenidos por Ramírez-Malagón *et al.*, (2007) quienes al adicionar estos reguladores de crecimiento obtuvieron formación de brotes en 10 especies de *Mammillaria*. Al adicionar ANA y BAP (M18), los explantes producen gran cantidad de tejidos calloso, resultados que concuerdan con Elías *et al.*, (2014) sobre *Echinocereus cinerascens*.

Con AIA, BAP y Hemisulfato de adenina (M19) se obtiene formación de callo, concordando con Torres-García, (2011) en donde al adicionar estos reguladores de

crecimiento en un cultivo de *Mammillaria huitzilopochtli* obtuvieron abundante proliferación de callo.

En cuanto a la respuesta morfogénica para los explantes de *Stenocereus pruinosus*, en el M4 y M13 la adición de auxinas (ANA) al medio de cultivo, permite que los explantes desarrollen abundantes raíces, pigmentación e incipiente formación de callo, difiriendo con Elías *et al.*, (2014) ya que obtuvieron mayores porcentajes de formación de raíces y callo al combinar ANA con BAP en *Echinocereus cinerascens* que al utilizarlos por separado. En el M6 (K) la respuesta morfogénica fue la formación de callo y pigmento, contrario a lo obtenido por Bhau y Wakhlu, (2015) quienes obtuvieron proliferación de brotes en *Coryphantha elephantidens*. Los resultados en cuanto a la formación de raíces para los tratamientos adicionados con ác. 2, 4, D y K (M7, M8, M9, M10 y M11) concuerdan con Karimi *et al.*, (2010), ya que al usar estos reguladores y al adicionar además al medio de cultivo agua de coco, obtienen altos porcentajes de raíz. Para el tratamiento M12 y M15 (BAP y 2, 4, D) la formación de callo concuerda, con lo reportado por Aíra *et al.*, (2005) sobre *Notocactus magnificus* Con el uso de 2, 4, D y K (M16) se logró la formación de callo, por lo que se difiere con lo reportado por Karimi *et al.*, (2010). En el M17 (AIA y K) la presencia de pigmento y callo es observada, estos resultados difieren con los obtenidos por Ramírez-Malagón *et al.*, (2007) quienes al adicionar estos reguladores de crecimiento obtuvieron formación de brotes en 10 especies de *Mammillaria*.

En cuanto a la formación de pigmento para el tratamiento M18 los resultados difieren con Elías *et al.*, (2014) en donde se utilizan los mismos reguladores de crecimiento (ANA y BAP) aunque en diferente concentración. Al adicionar al medio de cultivo los reguladores AIA, BAP y Hemisulfato de adenina (M19) se obtiene formación de callo, concordando con Torres-García, (2011), en donde al adicionar estos reguladores de crecimiento en un cultivo de *Mammillaria huitzilopochtli* obtuvieron abundante proliferación de callo.

Con respecto a los resultados de las pruebas químicas para identificación de grupos funcionales de los extractos de *P. schottii*, los resultados de la prueba de Baljet para detectar sesquiterpenlactonas resultó positiva solo para el extracto (11) metanólico, obtenido del medio 18 (ANA+ BAP) concordando con Morales, (2006), este grupo de

trabajo realizó estas pruebas de *P. schottii* de planta silvestre, sin embargo para la detección de lactonas obtuvieron resultados negativos, contrario a lo encontrado en el cultivo *in vitro* de los extractos metanólicos (8) obtenidos del M4 (ANA) y del extracto obtenido a partir del medio de cultivo que contenía 2, 4, D (ext. 9), en cuanto a la prueba de Molish para la detección de carbohidratos el extracto (26) metanólico obtenido a partir del M19 (hemisulfato de adenina, AIA y AIB), resultó negativo, sin embargo el resto de los extractos metanólicos probados fueron positivos (2, 8, 9, 11 y 14) concordando con Morales, (2006). La prueba de Salkowski para esteroides y triterpenos resultó positiva para los extractos metanólicos (2, 11 y 14) obtenidos de los extractos M4 (ANA), M18 (ANA y BAP) y planta silvestre respectivamente y negativa para los extractos metanólicos 8, 9 y 26 obtenidos del medio M4 (ANA), del medio adicionado con 2, 4, D y el medio M19 (hemisulfato de adenina, AIA y AIB) respectivamente esto último concordando con Morales, (2006). Para la prueba del H₂SO₄ para detectar flavonoides los extractos metanólicos 2 y 8 (obtenidos del M4, ANA) 9 (2, 4, D), 11 (M18, ANA+ BAP) y 14 (Obtenido de planta silvestre) resultaron positivos y el extracto 26 (Obtenido del M19, Hemisulfato de adenina, IBA, IAA) fue negativo al igual a lo obtenido por Morales, (2006). La prueba de Shinoda para detectar flavonoides fue positiva para el extracto 8 (obtenidos de M4, con Morales, (2006). En cuanto a la prueba de Lieberman-Burchard para la detección de triterpenos los extractos metanólicos que resultaron positivos fueron los extractos 8 (obtenidos de M4, ANA), 11 (obtenido del M18, ANA + BAP), 14 (obtenido de planta silvestre) y 26 (Obtenido de M19, hemisulfato de adenina, IAA, IBA), los extractos 2 (Obtenido de M4, ANA) y 9 (MS sin reguladores) resultaron negativos al igual que en el trabajo realizado por Morales, (2006). Para la prueba de Dragendorff para detectar alcaloides fue negativa para todos los extractos probados, contrario a lo obtenido por Morales, (2006). La prueba de bicarbonato de sodio para la detección de saponinas fue positiva para el extracto 2 (Obtenido de M4, ANA) , y negativa para los extractos 8 (obtenidos de M4, ANA), 9 (Obtenido de MS sin reguladores), 11 (obtenido del M18, ANA + BAP), 14 (obtenido de planta silvestre) y 26 (Obtenido de M19, hemisulfato de adenina, IAA, IBA) concordando esto último con Morales, (2006).

Las pruebas fitoquímicas del extracto hexánico No. 6 (Obtenido de M4, ANA) de *P. schottii* resultaron positivos para la prueba de carbohidratos de Molish y lactonas, bicarbonato de sodio y Salkowski para saponinas, H₂SO₄ para detectar flavonoides y aromaticidad prueba de ácido sulfúrico-formaldehído

Con respecto a los resultados de las pruebas químicas para identificación de grupos funcionales de los extractos metanólicos de *S. pruinosus* la prueba de insaturaciones de KMnO₄ resulto positiva para los extractos metanólicos: 3 (Obtenido de M7 (2,4, D + K)), 13 (Obtenido de planta), 17(Obtenido de M12 (2, 4, D y BAP)) y el extracto acidificado 27 (obtenido del M12, (BAP + 2, 4, D)) concordando con el extracto metanólico de planta silvestre reportado por Treviño, (2009), en cuanto a la prueba 2, 4-Dinitrofenilhidracina para el grupo carbonilo los extractos metanólicos que resultaron positivos fueron los extracto 1 (Obtenido de M8 (2, 4, D + K)), 3 (obtenido del medio M7 (2, 4, D + K)), 13 (obtenido de planta silvestre) además de los extractos acidificados 27 (obtenido de M12 (2, 4, D + BAP)) y 31 (obtenido de M18 (BAP + ANA)) contrario a lo obtenido por Treviño, (2009). La prueba de FeCl₃ para oxidrilos fenólicos fue positiva para los extractos metanólicos 13 (Obtenido de planta silvestre) y 17 (obtenido de M12 (2, 4, D + K)) y el extracto acidificado 27 (obtenido de M18 (BAP + ANA)) concordando con Treviño, (2009), en cuanto a la prueba de Lieberman-Buchard para esteroides y triterpenos, los resultados fueron positivos para los extractos metanólicos 13 (Obtenido de M7 (2,4, D + K)), 13 (Obtenido de planta), 17(Obtenido de M12 (2, 4, D y BAP)) y el extracto acidificado 27 (obtenido de M18 (BAP + ANA)) y 31, al igual que Treviño, (2009), la prueba de cumarinas fue positiva para los extractos metanólicos 13 (Obtenido de planta silvestre) y 17 (Obtenido de M12 (2, 4, D y BAP)) a diferencia de lo obtenido por Treviño (2009), para la detección de lactonas los resultados fueron positivos para los extractos metanólicos 13 (Obtenido de planta), 17 (Obtenido de M12 (2, 4, D y BAP)) y los extracto acidificados 27 (obtenido del M12, (BAP + 2, 4, D)) y 31 (obtenido de M18 (BAP + ANA)) al igual que lo obtenido por Treviño, (2009), en cuanto a la prueba de Baljet para sesquiterpenlactonas los extractos metanólicos positivos fueron el extracto 13 (Obtenido de planta) y el extracto 17 (Obtenido de M12 (2, 4, D y BAP)), concordando con Treviño, (2000), para la prueba de Salkowski para saponinas los extractos metanólicos positivos fueron el 1 (Obtenido de M8 (2, 4, D +

K)), 3 (obtenido del medio M7 (2, 4, D + K)), 13 (obtenido de planta silvestre) además de los extractos acidificados 27 (obtenido de M12 (2, 4, D + BAP)) y 31 (obtenido de M18 (BAP + ANA)) al igual que el extracto de planta silvestre reportado por Treviño, (2000), la prueba de Dragendorff para la detección de alcaloides fue negativa en todos los extractos metanólicos *in vitro* contrario a lo reportado por Treviño, (2009).

Las pruebas fitoquímicas de los extractos hexánicos No. 4 (obtenido del medio M7 (2, 4, D + K)), y 6 (Obtenido de M4 (ANA)), en cuanto a la prueba de insaturaciones de KMnO₄ resultó negativa contrario a lo obtenido por Treviño (2009), donde es evaluado el extracto hexánico de *S. pruinosus* de planta silvestre, en cuanto a la prueba 2, 4-Dinitrofenilhidracina para el grupo carbonilo los extractos resultaron negativos al igual que lo obtenido por Treviño, (2009), de igual manera ocurrió para oxidrilos fenólicos, en cuanto a la prueba de Lieberman-Buchard para esteroides y triterpenos, los resultados fueron negativos, difiriendo con Treviño, (2009), la prueba de cumarinas fue negativa a diferencia de lo reportado por Treviño, (2009), para la detección de lactonas los resultados fueron positivos para los extractos concordando con Treviño, (2009), en cuanto a la prueba de Baljet para sesquiterpenlactonas los extractos fueron negativos contrario con Treviño, (2009), para la prueba de Salkowski para saponinas los extractos fueron positivos al igual que el extracto reportado por Treviño, (2009), la prueba de Dragendorff para la detección de alcaloides fue negativa concordando con lo reportado por Treviño , (2009). Para *S. pruinosus* además se realizó un extracto de planta etanólico acidificado con HCl 3% (extracto 32, obtenido de planta silvestre), y en cuanto a las pruebas de tamizaje fitoquímico destaca la prueba de Dragendorff para la detección de alcaloides.

Esta diferencia en los resultados, puede deberse a la naturaleza del solvente utilizado ya que Valverde (2000) indica que según el tipo de solvente utilizado se extraerán diferentes compuestos, además estas discrepancias de los resultados comparando los extractos de planta silvestre a los obtenidos a partir del cultivo *in vitro* se deben en gran medida a los reguladores de crecimiento utilizados, ya estudios recientes indican que las auxinas juegan un papel crítico en las respuestas de las plantas al estrés (Liu *et al.* 2014) y con ello a la producción de metabolitos secundarios.

La prueba de *A. salina* para el extracto acidificado No. 32 (proveniente de planta silvestre de *S. pruinosus*) se obtuvo una DL_{50} de 79.6 $\mu\text{g/mL}$ lo que permite suponer que esta especie puede presentar compuestos activos (Lagarto Parra *et al.*, 2001), contrario con lo reportado por Treviño, (2009), que aun que fue un extracto metanólico y hexánico, se obtuvo nula actividad tóxica. Maldonado (2008) determinó la DL_{50} del extracto metanólico de *S. pruinosus* por medio de este bioensayo el cual no mostró un efecto tóxico al observarse una DL_{50} de 826.72 mg/mL. Este tipo de extracción (acidificada) fue la adecuada, además teniendo en cuenta que los factores ambientales afectan el tipo y concentración de los metabolitos secundarios (Valares 2011), para *P. schottii* la actividad tóxica sobre *Artemia salina*, de los extractos 31 obtenido de M18 (BAP + ANA), 29 (Obtenido de M19 (Hemisulfato, AIA, AIB)) y 27 (obtenido de M12 (2, 4, D + BAP)) se obtuvieron resultados menores a 1000 $\mu\text{g/mL}$ con una DL_{50} 152.4, 946.7 y 735.5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente lo que indica que los extractos probados pueden presentar compuestos activos (Lagarto Parra *et al.* 2001), el extracto metanólico No. 26 obtenido a partir del cultivo *in vitro* (obtenido de M19 (hemisulfato de adenina, AIA y AIB)) presentó una DL_{50} de 282.2 $\mu\text{g/mL}$ contrario a lo reportado por Morales, (2006).con una DL_{50} de 64.57 $\mu\text{g/mL}$.

En cuanto a la actividad bactericida para *P. schottii*, las cepas que sufrieron inhibición fueron: *S. aureus*, a partir de los extractos metanólicos 2, 8 (obtenidos del M4, ANA) y 10(obtenido de M6, K), *S. typhimurium* a partir del extracto metanólicos 2 (obtenido del M4, ANA), del extracto hexánico 6 (obtenido de M4, ANA) y del extracto acuoso 19 (obtenido a partir de planta silvestre), *E. coli* y *B. cereus* a partir del extracto hexánico 6 (obtenido del M4, ANA), resultados que difieren con lo reportado por Morales, (2006) ya que el extracto de planta silvestre tuvo inhibición sobre *L. monocitogenes*, y para los extractos del cultivo *in vitro* no fue activo.

Para los extractos de *S. pruinosus* la actividad bactericida relevante fue sobre las cepas: *S. aureus*, a partir de los extractos metanólicos 1 (obtenido a partir de M8, 2, 4, D + K), 12 (obtenido a partir de fruto), 13 (obtenido de planta silvestre), 17 (obtenido a partir de M12, 2, 4, D+ BAP) y del extracto hexánico 4 (obtenido a partir de M8, 2, 4, D + K) para *S. typhimurium* a partir del extracto metanólico 16 (Obtenido a partir de M7,

2,4,D+K), para *E. coli* a partir del extracto hexánico 4 (obtenido del M4, ANA) y *L. monocytogenes*, a partir de los extractos metanólicos 1 (obtenido a partir de M8, 2, 4, D + K), 15 (obtenido de M6, K) y 17 (obtenido a partir de M12, 2, 4, D+ BAP) resultados que concuerdan con lo obtenido por Treviño (2009), en el cual evaluaron extractos de planta silvestre de dicha especie.

En cuanto a la actividad fungicida ambas especies no presentaron actividad, difiriendo con Treviño, (2009) para extractos de planta silvestre en donde obtuvieron halos de inhibición sobre *T. tonsurans* y *M. nanum*. y con Maldonado (2008).

En cuanto a la actividad antioxidante por el método de DPPH para *P. schottii* los extractos que mostraron mejor actividad fue el extracto metanólico *in vitro* No 11 el cual se obtuvo a partir del M18 (ANA+ BAP) teniendo una mejor EC₅₀ que el obtenido por Morales *et al.*, (2010b), en cuanto *S. pruinosus* los extractos que presentaron una menor EC₅₀ fueron el extracto metanólicos *in vitro* 7 (obtenido de M18, ANA+ BAP) y 17 (obtenido de M12, 2, 4, D + BAP) difiriendo con Treviño, (2009), ambas especies incluso tuvieron una EC₅₀ menor al control (vitamina C) utilizado, por lo que para ambas especies el componente probable de la actividad antioxidante son los compuestos fenólicos particularmente los flavonoides, los cuales han sido aislados de cactáceas y pueden contribuir directamente en la acción antioxidante (Qui *et al.*, 2002).

La prueba de decolorización de ABTS, el extracto metanólico 11 (Obtenido a partir del M18 (ANA+ BAP)) e *P. schottii* obtuvo 122.7 equivalentes de trolox (µg/mL) y la cuantificación de fenoles totales dio como resultado 58.6 µg/mL equivalentes de ácido gálico contrario a lo obtenido por Morales *et al.*, (2010b) el cual fue de 73 µg/mL equivalentes de ácido gálico.

Para la comparación de los extractos silvestres e *in vitro* de *P. schottii* mediante la cromatografía en capa fina, se obtuvo que el extracto 1 (obtenido de M8, 2, 4, D + K) y 14 (obtenido de planta silvestre) perteneciente a extracciones de planta *in vitro* y silvestre respectivamente, presentan una banda de color morado la cual, puede ser probable que se trate de un esterol, concordando con (Orozco-Barocio *et al.*, 2013) el cual indica la presencia de este compuesto para *P. schottii*. En cuanto a *S. pruinosus* se observó en el extracto hexánico 4 (obtenido a partir de M8, 2, 4, D+ BAP) la presencia

de aceites, así como en el extracto 6 de *P. schottii* (obtenido a partir del M4, ANA) esto puede ser debido a la naturaleza del compuesto (Valverde, 2000).

Los resultados de este estudio son muy prometedores, ya que se garantiza el resguardo de las especies silvestres, sin embargo en cuanto a las diferencias de la actividad biológica comparando los extractos silvestres con los obtenidos a partir del cultivo *in vitro*, en algunas pruebas resultaron con mayor actividad los extractos silvestres, es recomendable el uso de elicitores para incrementar el contenido de metabolitos (Lucchesini y Mensuali-Sodi., 2010).

10. CONCLUSIONES

- *P. schottii* y *S. pruinosus* cultivadas *in vitro* desarrollaron: raíz, brote, callo y pigmento.
- Las pruebas de tamizaje fitoquímico de los extractos hexánicos, metanólicos y acidificados de *P. schottii* determinó la presencia de sesquiterpenlactonas, lactonas, esteroides, triterpenos, flavonoides, y saponinas, y para *S. pruinosus* de oxidrilos fenólicos, esteroides, triterpenos, cumarinas, lactonas, sesquiterpenlactonas, saponinas y alcaloides.
- Para la prueba de toxicidad sobre *A. salina*, el mejor resultado lo obtuvo *P. schottii*, a partir del extracto 26 (obtenido de M19, Hemisulfato de adenina + AIA + BAP) Los extractos de *P. schottii* resultaron bactericidas, sobre las cepas de *S. aureus*, a partir de los extractos metanólicos 2, 8 (obtenidos del M4, ANA) y 10 (obtenido de M6, K), *S. typhimurium* a partir del extracto metanólicos 2 (obtenido del M4, ANA), del extracto hexánico 6 (obtenido de M4, ANA) y del extracto acuoso 19 (obtenido a partir de planta silvestre), *E. coli* y *B. cereus* a partir del extracto hexánico 6 (obtenido del M4, ANA) *S. typhimurium*, *E. coli* y *B. cereus*. Los de *S. pruinosus* resultaron activos, sobre las cepas, *S. aureus*, a partir de los extractos metanólicos 1 (obtenido a partir de M8, 2, 4, D + K), 12 (obtenido a partir de fruto), 13 (obtenido de planta silvestre), 17 (obtenido a partir de M12, 2, 4, D+ BAP) y del extracto hexánico 4 (obtenido a partir de M8, 2, 4, D + K) para *S. typhimurium* a partir del extracto metanólico 16 (Obtenido a partir de M7, 2,4,D+K), para *E. coli* a partir del extracto hexánico 4 (obtenido del M4, ANA) y *L. monocytogenes*, a partir de los extractos metanólicos 1 (obtenido a partir de M8, 2, 4, D + K), 15 (obtenido de M6, K) y 17 (obtenido a partir de M12, 2, 4, D+ BAP).
- La actividad antioxidante con el método de DPPH, fue relevante para ambas especies.

- En cuanto al ensayo de ABTS y la cuantificación de fenoles totales por el método de Folin Ciocalteu solo el extracto acidificado No.26 (obtenido a partir del M19, (hemisulfato de adenina + IBA + BAP) de *P. schottii*, resultó relevante.
- La cromatografía en capa fina, reveló la posible presencia de esteroides en los extractos 1 (obtenido de M8, 2, 4, D + K) y 14 (obtenido de planta silvestre) de *P. schottii*, y la posible presencia de aceites esenciales en los extractos 4 (obtenido a partir de M8, 2, 4, D+ BAP) y 6 (obtenido a partir del M4, ANA) de *P. schottii* y *S. pruinosus* respectivamente.

11. LITERATURA CITADA

1. Aíra L, Salvador RC, Gallo LA, Tiago E, Soares ME. 2006. *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. Plant cell, tissue and organ culture, 84: 165-169.
2. Akalezi C, Liu S, Li Q, Yu J, Zhong. J. 1999. Combined effects of initial sucrose concentration and inoculum size on cell growth and ginseng saponin production by suspension cultures of *Panax ginseng*. Process Biochemistry 34(6): 639-642.
3. Anderson EF. 2001. The Cactus Family. Timer Press. Oregón. EUA. Pp. 536,537 y 647.
4. Angulo-Bejarano PI, Paredes-López O. 2011. Development of a regeneration protocol through indirect organogenesis in prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill). Sci Hort. 128:283-288.
5. Aparecida S, Pires MF, Machado S, Priolo AJ, Aparecida C. 1995. *In vitro* propagación of *Cereus peruvianus* MILL (Cactaceae). *In vitro* cell and development biology. 31 (47-50)
6. Arellano-Perusquía AM, López-Peralta M.C, Chablé-Moreno F, Estrada-Luna A. 2013. Effect of growth regulators on the organogenesis and multiplication. Propagation of ornamental plants. 13(4):160–167.
7. Arias, M.; Angarita, M.J., Velásquez, A.M., Aguirre Cardona, J.M. Restrepo Flores y C. Montoya Vallejo, (2009) “Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales” en *Rev. Fac. Nac. Agron. (Medellín)* 62(1), pp. 4881-4895.
8. Bendich A. 1990. Antioxidant micronutrients and immune responses. Ann N. Y. Acad. Sci. 587:168-80.
9. Benson. 2001. Microbiological Applications. Laboratory Manual in General Microbiology. The McGraw-Hill. Eight Edition. P. 59, 64.
10. Bhau BS, Wakhlu K. 2015. A highly efficient *in vitro* propagation protocol for elephant tusk cactus: *Coryphantha elephantidens* (Lem.) Lem. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, pp.3–7.
11. Bhojwani SS, Dantu PK. 2013. Plant tissue culture: An introductory text. Springer Verlag.

12. Biradar YS, Jagatap S, Khandelwal KR, Singhania SS. 2008. Exploring of antimicrobial activity of *Triphala mashi*, and ayurvedic formulation. Evid Based Complement Alternat Med; 5(1):107-113.
13. Bravo HH, Sánchez MH. 1978. Las Cactáceas de México. Vol. I. Universidad Autónoma de México: México D.F, pp 37, 70, 71, 72, 78 y 81, 105, 107, 108, 109, 138, 139, 140, 611-622.
14. Bravo HH, Scheinvar L. 1995. El interesante mundo de las Cactáceas. CONACYT y Fondo de Cultura Económica: México D.F, pp 127. 161 y 162.
15. Bruhn Jan G. 1971. Alcaloides en las Cactáceas. Revista; Cactáceas y succulentas. Tomo 16 (3) Pp. 51-58.
16. Cannell, R.J.P. 1998. Natural Products Isolation, Humana Press, Totowa, New Jersey, 53-230.
17. Correa S.R, Silva BE, Alexópulos FF, Nascimento BD, Rodríguez VA, Dos Santos VJ. 2012. Antibacterial activity of medicinal plants against multidrug-resistant bacteria. Pp.4841–4847.
18. Cottele N., J. L. Bernier, J. P. Catteau, P. Pommery, J. C. Wallet, E. M. Gaydou., 1996. Antioxidant properties of hydroxyl-flavones. Free Radical Biol. Med. 20:35-43.
19. Davicino R, Mattar MA, Casali YA, Correa SG, Pettenati EM, Micalizzi B. 2007. Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. Revista peruana de biología 14(2): 247-251.
20. Davison CH, Low JC, Woolhouse ME. 2000. What is antibiotic resistance and how can we measure it? Trends Microbiol; 8: 554-559.
21. De Aguilar DL, DA Silva M, Ribeiro S, Costa de Carvalho K, Albarello N. 2015. Production of betalains from callus and cell suspension cultures of *Pereskia aculeata* Miller, an unconventional leafy vegetable. Plant Cell tissue organ cult 122:341-350.
22. Dodds JH, Roberts LW. 1995. Experiments in plant tissue culture. Third Edition. Cambridge University Press. N.Y.
23. Domínguez X. A. 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica. 1ª. Edición. Limusa. México. Pp. 84-85.

24. El-Agbar ZA, Shakya KA, Khalaf NA, Al-Haroon M, 2007. Comparative Antioxidant Activity of Some Edible Plants. *Turk J Biol*, 32:193–196.
25. Elías H, Taha RM, Hasbullah, N, Mohamed, M., Abdul MA, Noraini M, Mohajer S. 2014. The effects of plant growth regulators on shoot formation, regeneration and coloured callus production in *Echinocereus cinerascens in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 120(2):729–739.
26. Esparza Izunsa R. S. 2004. Formación de callo e inducción de un cultivo de células en suspensión en *Lophophora williamsii*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana.
27. Falco SA, Martínez J, Rodríguez JL, De Villavicencio NM, Sevillano E. 2011. Actividad antimicrobiana de extractos hidroetanólicos de limoncillo (*Cymbopogon citratus*) y cúrcuma (*Curcuma longa*). *Revista venezolana de Ciencia y tecnología de alimentos*: Vol. 2.
28. Fedoreyev SA, Pokushalova TV, Veselova MV, Glebko, GL, Kulesh, NI Muzarok TI, Seltskaya, LD Bulgakov VP, Zhuravlev YN. 2000. Isoflavonoid production by callus cultures of *Maackia amurensis*. *Fitoterapia* 71(4): 365-372
29. Fehér A, Pasternak T, Dudits D. 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. (74): 201–228.
30. Fenner R, Sortino M, Rates SM. 2005. Antifungal activity of some Brazilian *Hypericum* species. *Phytomedicine*. 12(3): 236-240.
31. Floegel A, Dae-Ok K, Sang.-Jin C, Sung IK, Ock KC, 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7):1043–1048.
32. García-Cruz L. Valle-Guadarrama S, Salinas-Moreno Y, Luna-Morales C. 2016. Postharvest quality, soluble phenols, betalain content, and antioxidant activity of *Stenocereus pruinosus* and *Stenocereus stellatus*. *Postharvest biology and technology*. Pp: 69-76.
33. García-Rubio O, Malda-Barrera G. 2010. Micropropagation and Reintroduction of the Endemic *Mammillaria mathildae* (Cactaceae) to Its Natural Habitat. *HortoScience*. 45(6): 934–938.

34. George EF, Hall MA, y GJ. De Klerk. 2008. The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro- and Micro-Nutrient. In: Plant propagation by tissue culture 3rd edition, Vol. 1 the Background. Thorpe, T., C. Stasolla, E.C. Yeung, GJ. de Klerk, A. Roberts and E.F. George, pp. 65-114.
35. George, EF. Hall, MA. y GJ. De Klerk (2008). *Plant propagation by tissue culture*. 3rd edition, Springer. pp. 1-28
36. Girois SB, Chapuis F, Decullier E. 2005. Adverse effects of antifungal therapies in invasive fungal infections: review and meta-analysis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 24(2): 119-130.
37. Guerra M, Vega R, Rivero R., Menéndez R, Gutiérrez A y Guerra I. 2004. Actividad Antimicrobiana y toxicidad de un extracto acuoso de *Boerhavia erecta* L. *Revista Cubana Plana Medica* 9(1):1-8.
38. Huang SY, Chen SY, Wu KL, Taung WT. 1995. Strategy for inducing pertinent cell line and optimization of the medium for *Stizolobium hassjoo* producing L DOPA. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 79(4): 342-347.
39. Jiménez VM.2005. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulations* 47(2-3): 91–110.
40. Johnson IT. 2001. Antioxidants and antitumour properties J. Pokorny, N. Yanishlieva, M. Gordon (Eds.), *Antioxidants in food*, Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, pp. 100–123.
41. Karimi N, Mofid MRE, Ebrahimi M, Naderi R. 2010. Effect of areole and culture medium on callus induction and regeneration *Cereus peruvianus* Mill (Cactaceae). *Trakia Journal of sciences*. 8(2):31–35.
42. Kartosentono S, Imdrayanto G, Zaini NC. 2002. The uptake of copper ions by cell suspension cultures of *Agave amaniensis*, and its effect on the growth, amino acids and hecogenin content. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 68(3): 287-292.
43. Kazuko. AM, Encarnación DR, Cortés AA. 2005. Evaluación toxicológica de productos naturales usando microtécnicas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 36 (1):11-17.

44. Kircher HW. 1969. The distribution of sterols, alkaloids and fatty acids in senita cactus, *Lophocereus schottii*, over its range in Sonora, Mexico. *Phytochemistry*. 8: 1481-1488.
45. Kuklinski, C. 2000. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Editorial Omega S.A. 106-183
46. Lagarto-Parra A, Silva-Yhebra R, Guerra Sardiñas I, Iglesias Buela L. 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀) in mice in order to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine* 8(5): 395-400.
47. Liu L, Guo G, Wang Z, Ji H, Mu F, Li X, 2014. Auxin in plant growth and stress response. In: *Phytohormones: A Window to metabolism, signaling and biotechnological applications*. Phan L-S and Pal S. (Eds). Yokohama, Kanagawa, Japan, pp. 1-36.
48. Liu, S. and J.J. Zhong. 1996. Effects of potassium ion on cell growth and production of ginseng saponin and polysaccharide in suspension cultures of *Panax ginseng*. *Journal of Biotechnology* 52(2): 121-126.
49. Lucchesini M and Mensuali-Sodi. A 2010. Plant tissue culture—an opportunity for the production of nutraceuticals. In: Giardi MT, Rea G, Berra B (Eds) *Bio-farms for nutraceuticals*. Springer, Berlin, pp 185–202
50. Machakova I, Zazimalova E, George EF. 2008. The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro- and Micro-Nutrient. In: *Plant propagation by tissue culture 3rd edition, Vol. 1 the Background* Thorpe, T., C. Stasolla, E.C. Yeung, G-J. de Klerk, A. Roberts and E.F. George, pp. 175-204.
51. Maldonado V. Ma. de los Ángeles., 2008. Actividad fungicida y análisis fitoquímico de tres especies de cactáceas: *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lemaire ex K. Schumann), *Echinocereus stramineus* (Engelmann) y *Stenocereus pruinosus*. (Otto)". Tesis de licenciatura. Fac. de Ciencias Biológicas. UANL.
52. McLaughlin JL, Chang Ch, Smith DL. 1988. Simple bioassay for the detection and isolation of bioactive natural products. Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, School of Pharmacy and Pharmacal Sciences, Purdue

University, West Lafayette, IN 47907, USA.

53. Mesa Arango AC, Bueno Sánchez JG, Betancur LA Galvis, 2004. Productos Naturales con actividad antimicótica. Revista Española de Quimioterapia Prous Science, S. A. Sociedad Española de Quimioterapia 17 (4): 325-331.
54. Molina-Salinas, G.M. 2001. Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos y hexánico del clavo (*Eugenia caryophyllata*). Tesis de Doctorado. UANL.
55. Morales RME. 2006. Extractos de *Lophocereus schottii* (Engelm) Britton and Rose y *Stenocereus gummosus* (Engelmann) Gibson y Horak con actividad antibacteriana y antineoplásica sobre líneas celulares humanas. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León
56. Morales Rubio ME, Verde Star J, Oranday Cárdenas A, Rivas Morales C, Arévalo Niño K, Treviño Neáñez JF, Carranza Rosales P y Cruz Vega DE. 2007. Actividad biológica de *Lophocereus schottii* (Engelm) Britton and Rose. RESPYN. Ed. Especial # 7.
57. Morales-Rubio E Treviño-Neáñez JF, Viveros Valdéz E. 2010b. Free Radical Scavenging Activities of *Lophocereus schottii* (Engelmann). International Journal of Natural and Engineering Sciences 4 (1): 65-68.
58. Morales-Rubio, ME, Morales-Vallarta MR, Treviño-Neáñez JF, Garza-Padrón RA, Rodríguez-Garza RG, Mar-Aguilar F, Reséndez-Pérez D, Verduzco-Martínez JA, Cavazos-González R, Elizondo-Herrera A, Barrón-González MP. 2010a. Actividad amebicida de extractos de tejidos *in vivo* e *in vitro* de cuatro especies de cactáceas sobre *Entamoeba histolytica* Revista internacional de ciencia y tecnología biomédica 1(2): 1-13
59. Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant 15:473-97.
60. Murphy CM, 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews. 564-582.
61. Navarro García VM, González A, Fuentes M. 2003. Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology 87(1): 85-88.

62. Neumann K, Kumar A, Imani J. 2009a. Historical Developments of Cell and Tissue Culture Techniques en Neumann, K., Kumar, A., & Imani, J. Plant cell and tissue culture: A tool in biotechnology: Basics and application. Springer Verlag, pp. 7-12.
63. Neumann, K., Kumar, A., & Imani, J. 2009b. Callus cultures, Neumann, K., Kumar, A., & Imani, J. Plant cell and tissue culture: A tool in biotechnology: Basics and application (Pp. 13-42). Springer Verlag.
64. Nogueira RC, Paiva R, Oliveira LM, Soares GA, Soares FP, Castro AHF, Paiva PDO. 2007. Callus induction in leaf explants of murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss). Ciencia Agrotecnología. 31(2):366–370.
65. Ochoa-Alejo N. 1990. Establecimiento de cultivos *in vitro*. Fundamentos teóricos y prácticos de cultivos de tejidos vegetales. Codmo H. Rossell y Víctor M. Villalobos. Roma: FAO, pp 23-27.
66. Oncina, R., Botía, J.M. Del Río J.M, Ortuño A. 2000. Bioproduction of diosgenin in callus cultures of *Trigonella foenum-graecum* L. Food Chemistry 70(4): 489-492.
67. Opatrný Z. 2014. From Nemec and Haberlandt to Plant Molecular Biology. In: Applied plant cell biology cellular tools and approaches for plant biotechnology, Nick P and Opatrný Z (Eds). Springer: Verlag Berlin Heidelberg, pp. 1-38.
68. Orozco-Barocio, A, Paniagua-Domínguez BL, Benítez-Saldaña PA, Flores-Torales E, Velázquez-Magaña S, Arreola Nava H. 2013. Cytotoxic effect of the ethanolic extract of *Lophocereus schottii*: A Mexican medicinal plant. African journal traditional complement alternative medical 10 (3): 397-404
69. Prateek KT, Ravichandran V, Sharma S, Agrawal KR. 2008. The Antioxidant Activity of Some Medicinal Plants. Turk J Biol, 32:97–202.
70. Qiu Y, Chen Y, Pei Y, Matsuda H, Yoshikawa M. 2002. Constituents with radical scavenging effect from *Opuntia dillenii*: structures of new alpha-pyrones and flavonol glycoside, Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 50:1507-1510.
71. Ramachandra S, Ravishankar G. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances 20(2): 101-153.

72. Ramírez-Malagón R, Aguilar-Ramírez I, Borodanenko A, Pérez-Moreno L, Barrera-Guerra JL, Nuñez-Palenius, HG, Ochoa-Alejo N. 2007. *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *In vitro* cell developmental plant. 43(6):660–665.
73. Raval K, Hellwing S, Prakash G, Ramos A, Srivastava A, Büchs J. 2003. Necessity of two stage process for the production of azadirachtin related limonoids in suspension cultures of *Azadirachta indica*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 96(1): 16-22.
74. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology Medicine*. Vol 26 No. 9-10 Pp. 1231-1237.
75. Ríos J.L, Recio MC, Villar L. 1988. Screening methods for natural products UIT antimicrobial activity a review of literature. *Journal of Ethnopharmacology*. 23: 127-149.
76. Robledo-Paz A, Vázquez-Sánchez MN, Adame-Álvarez RM, Jofre-Garfias AE. 2006. Callus and Suspension Culture Induction, Maintenance, and Characterization. *Plant Cell Culture Protocols*. Loyola-Vargas VM, Vázquez-Flota F. Totowa, NJ: Humana Press. 2° edition, pp. 59-70.
77. Robles-Martínez M, De la Rosa APB, Santos-Díaz MS, Guéraud F, Negre-Salvayre A, Rossignol, M. 2016. Establishment of callus and cell suspensions of wild and domesticated *Opuntia* species: Study on their potential as a source of metabolite production. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 124(1): 181-189
78. Robles-Zepeda RE, Jiménez-Estrada MA, Navarro-Ocaña, Saad-Villegas I, Brunner I, Ruiz-Bustos E. 2009. Secondary metabolites induction in *Mammillaria huitzilopochtli* (Cactaceae) and evaluation of the fungicidal activity. *African Journal of Biotechnology* Vol. 8(16): 3874-3878.
79. Roca WM., Mroginski LA. 1991. Establecimiento de un Laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales. *Cultivos de tejidos en la Agricultura*. Ed. Por W.M. Roca y L. A. Mroginski. CIAT. Colombia. pp. 211-238, 969.

80. Rodríguez Garza R., Morales Rubio ME, Verde Star MJ., Oranday Cárdenas A, Rivas Morales C, Núñez González A, González González GM, Treviño Neávez JF. 2010. Actividad antibacteriana y antifúngica de las especies *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lemaire) y *Ariocarpus retusus* (Scheidweiler) (Cactaceae). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 41(1):55-59.
81. Sánchez E, Dávila-Aviña J, Castillo SL, Heredia N, Vázquez-Alvarado R, Gracia S. 2014. Antibacterial and antioxidant activities in extracts of fully grown Cladodes of cultivars of cactus pear. *Journal of food science*, 79(4): 1-6.
82. Santos-Díaz MS, Velásquez-García y González-Chávez MM. 2005. Producción de pigmentos por callos de *Mammillaria candida* Scheidweiler. (Cactaceae). *Agrociencia*, 39: 619-626.
83. Sato, K., M. Nakayama and J.I. Shigeta. 1996. Culturing conditions affecting the production of anthocyanin in suspended cell cultures of strawberry. *Plant Science* 113(1): 91-98.
84. Shafiei S, Kariminik A, Hasanabadi Z. 2013. Antimicrobial activity of methanol extract of *Opuntia stricta* F. *International Research Journal of Applied basic science* 7(12): 907-910.
85. Shaza A, Fadel AL, Frdoos M. 2014. Antibacterial Activity of Various Plants Extracts against Antibiotic-resistant *Aeromonas hydrophila*. *Jundishapur journal of microbiology*, 7(7).
86. Silva S. Y., 1999. Análisis fitoquímico y efecto antimicrobiano de 2 especies de plantas tóxicas *Schinus molle* y *Nerium oleander*. Tesis. Licenciatura. FCB UANL. San Nicolás de los Garza N. L.
87. Smith Rh, 2013. Callus induction. In: *Plant Tissue Culture*. Third Edition, pp. 63-76.
88. Taylor P. W. 2013. Alternative natural sources for a new generation of antibacterial agents. *Int J Antimicrob Agents*; 42: 195-201.
89. Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Hawkins D. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7): 669–675.

90. Torres García f. 2011. Germinación *in vitro* y cinética de crecimiento de *Mammillaria huitzilopochtli* D.R. Hunt. Tesis de experiencia profesional. Universidad Veracruzana Facultad de Biología. Xalapa Veracruz.
91. Trejo-Tapia, G y Rodríguez-Monroy M. 2007. La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales *in vitro*. *Interciencia* 32 (10): 669-674
92. Treviño Neávez. 2000. Análisis fitoquímico de callo y plántula de *Stenocereus griseus* Haworth, y posibles usos del extracto. Tesis de Maestría. Fac. de Ciencias Biológicas UANL: pp: 22-23.
93. Treviño Neávez. 2009. Actividad biológica y componentes presentes en *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lemaire ex K. Schumann), *Echinocereus stramineus* (Hengemann) y *Stenocereus pruinosus*, (Otto). Tesis de Doctorado. Fac. de Ciencias Biológicas UANL: pp: 57-65.
94. Treviño, JF; Rodríguez RG, Garza, Verde Star MJ, Morales Rubio ME, Garza Padrón R.A, Rivas Morales C, Oranday Cárdenas, A. 2011. Actividad antifúngica de *Stenocereus pruinosus* y *Echinocereus stramineus*. *Revista Mexicana Ciencias Farmacéuticas*, 43(1): 42-48.
95. Valares C. 2011. Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente. Tesis doctoral. Universidad de Extremadura, pp: 13-19.
96. Valverde Macedo E. 2000. Extracción de materias primas vegetales. En: Fundamentos de tecnología de productos terapéuticos, Sharapin. Programa iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo: Santiago de Bogotá Colombia, pp. 27-60.
97. Vanisree M, Tsay HS. 2007. Plant cell cultures: Production of biologically important secondary metabolites from medicinal plants of Taiwan. Kayser O, Quax W (Eds) *Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp. 267-285.
98. Verpoorte R. 2002. Plant secondary metabolism. En Verpoorte R, Alfermann AW (Eds.) *Metabolic Engineering of Plants Secondary Metabolism*. Kluwer. Dordrecht, Holanda. pp: 1-29.

99. Waksmundzka-Hajnos M., Sherma J, Kowalska T. 2008. Thin layer chromatography in phytochemistry. Taylor & Francis Group, LLC. Pp. 82.
100. Wani MC, Thompson JB, Taylor HL, Monroe EW, Miller RW, McPhail AT. 1980. X-Ray crystal and molecular structure of the racemic dimerictetrahydroisoquinoline alkaloid lophocine, probably an artefact from *Lophocereus schottii*. Journal of Chemical Research S, (1):15.
101. Wilken, D, Jiménez E, Hohe A, Jordan M, Gómez R, Schmeda G, Gerth A. 2005. Comparison of secondary plant metabolite production in cell suspension, callus culture and temporary immersion system. Hvoslef-Eide AK, Preil W (Eds) Liquid culture systems for in *vitro* plant propagation, pp. 525–537. Springer, Dordrecht
102. Yesil-Celiktas O, Gurel A, Vardar-Sukan F. 2010. Large Scale Cultivation of Plant Cell and Tissue Culture in Bioreactors, Trans world Research Network Kerala, India: Pp: 1- 10.
103. Zhang JD, Cao YB, Xu Z. 2005. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the eight steroid saponins from *Tribulus terrestris* L. with potent activity against fluconazole-resistant fungal pathogens. Biological and pharmaceutical bulletin 28(12):2211-2215.

MATERIAL ELECTRÓNICO

104. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional. 2009. Atlas de Plantas de la medicina tradicional Mexicana. [internet] Disponible en el sitio de red <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php>. Revisado en la página de Internet el 9 de noviembre del 2015.
105. Plantas del desierto. *Lophocereus schottii*. [internet] disponible en el sitio de red <http://desertplants.clawz.com/index.htm> Revisado en la página de Internet el 9 de noviembre del 2015.
106. Desmarchelier C, Ciccía G, 1998. Antioxidantes de Origen Vegetal. Ciencia Hoy, Vol. 8, (44) [internet] disponible en el sitio de red.

<http://www.cienciahoy.org.ar/ch/hoy44/antiox1.htm>. Revisado en la página de Internet el 4 de octubre del 2016.

12 RESUMEN BIOGRÁFICO

Mariana Pedraza Zamora

Candidato para el Grado de

Doctorado en Ciencias

Con Acentuación en Química de Productos Naturales

Tesis: Cultivo *in vitro* de *Pachycereus schottii* y *Stenocereus pruinosus* para la obtención de metabolitos secundarios de importancia medica.

Campo de Estudio: Biotecnología Vegetal y Química de Productos Naturales

Datos Personales: Nacida en la ciudad de Monterrey N.L. El 13 de abril de 1987.

Educación: Egresada de la Facultad de ciencias Biológicas con el grado de Bióloga en el año 2009.

Experiencia Profesional: Impartiendo clases, nivel Licenciatura en la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL y nivel medio superior en el Colegio Aída Rodríguez Sánchez.